

Molekylære responsmarkører for immundempende behandling hos transplanterte

Utvikling av metode for farmakodynamisk monitorering av mTOR-hemmere

Masteroppgave i farmakologi

Randi Larsen



Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Avdeling for medisinsk biokjemi

Oslo universitetssykehus

15. mai 2010

Forord

Dette mastergradsprosjektet ble gjennomført ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet, i perioden fra august 2009 til mai 2010. Mine eksterne veiledere var Nils Tore Vethe og Stein Bergan. Anders Åsberg var internveileder.

Tiden på Rikshospitalet har vært en utrolig lærerik og morsom tid. Jeg har storkost meg både med det faglige arbeidet, og i det sosiale miljøet.

Jeg vil gjerne takke Nils Tore for en flott innsats som veileder. Du stiller alltid opp, svarer alltid på spørsmål og har gitt meg kjempegod opplæring og oppfølging.

Selv om det har vært et travelt år for deg, Stein, var du alltid interessert i hvordan ting gikk, og var alltid villig til å hjelpe når jeg lurte på noe. Det har jeg satt stor pris på.

Jeg vil takke Sara, Ingjerd, Hanne og alle bioingeniørene på SAFE for all hjelp, og et inkluderende og godt sosialt miljø. Jeg vil også takke de som har hjulpet meg til å bli kvitt min frykt for blodprøver. Det vil komme til nytte resten av livet.

Til slutt vil jeg takke Øystein, mamma og pappa for all hjelp, oppmuntring og støtte gjennom året med mastergrad og resten av studietiden.

Randi Larsen

Lillestrøm, mai 2010.

Innhold

FORORD	2
INNHold	3
FORKORTELSER	6
SAMMENDRAG	9
1 INNLEDNING	10
1.1 ORGANTRANSPLANTASJON	10
1.1.1 <i>Generelt om transplantasjon</i>	10
1.1.2 <i>Historie</i>	10
1.1.3 <i>Organtransplantasjon og vevsforlikelighet</i>	11
1.1.4 <i>Ulike avstøtningsreaksjoner</i>	12
1.1.5 <i>Immundempende behandling</i>	13
1.1.6 <i>Monitorering av immundempende legemidler</i>	16
1.2 MTOR	17
1.3 MTOR-HEMMERE	19
1.3.1 <i>Generelt om sirolimus</i>	19
1.3.2 <i>Farmakodynamikk</i>	20
1.3.3 <i>Farmakokinetikk</i>	21
1.3.4 <i>TDM (terapeutisk legemiddelmonitorering)</i>	22
1.3.5 <i>Genetikk</i>	22
1.3.6 <i>Interaksjoner</i>	23
1.3.7 <i>Bivirkninger</i>	23
1.3.8 <i>mTOR-hemmere og kreft</i>	24
1.3.9 <i>Ulikheter mellom sirolimus og everolimus</i>	24
1.4 BAKGRUNN FOR METODE	25
1.4.1 <i>Metodeutvikling</i>	25
1.4.2 <i>GFP-4E-BP1-enzymassay</i>	25

1.4.3	<i>p70 S6 Kinase-assay</i>	26
2	HENSIKT	28
3	MATERIALER	29
3.1	UTSTYR	29
3.2	REAGENSER.....	31
4	METODER	34
4.1	CELLEISOLERING OG STIMULERING.....	34
4.1.1	<i>Isolering av mononukleære celler fra blod (PBMC)</i>	34
4.1.2	<i>Isolering av CD4+ celler</i>	34
4.1.3	<i>Telling av isolerte celler</i>	35
4.1.4	<i>Immunpresipitering av p70 S6 Kinase</i>	35
4.1.5	<i>Stimulering av PBMC</i>	37
4.1.6	<i>Stimulering av CD4+ celler</i>	37
4.2	ENZYMASAY	38
4.2.1	<i>Enzymassay med GFP-4E-BP1 som substrat</i>	38
4.2.2	<i>Enzymassay med p70 S6K</i>	38
4.3	PRØVEOPPARBEIDELSE	39
4.3.1	<i>Ekstraksjon av purinnukleotider</i>	39
4.3.2	<i>Proteinfelling for analyse på LC-MS/MS</i>	39
4.4	KVANTIFISERING	39
4.4.1	<i>HPLC-metode</i>	39
4.4.2	<i>Luminescens</i>	40
4.4.3	<i>LC-MS/MS-metode</i>	41
4.4.4	<i>Databehandling/avlesing av resultater</i>	42
4.5	ETISKE ASPEKTER	43
5	RESULTATER	44
5.1	TESTING AV KVANTIFISERINGSMETODER	44
5.1.1	<i>Sammenligning av HPLC-UV og luminescenskvantifisering</i>	45
5.1.2	<i>Utpøving av LC-MS/MS-analyse av p70 S6K-substrat</i>	46

5.2	UTPRØVING AV 4E-BP1 ENZYMASSAY	48
5.2.1	<i>Ustimulerte PBMC</i>	48
5.2.2	<i>PBMC stimulert med insulin</i>	53
5.2.3	<i>CD4+ celler stimulert via CD3-, CD28- og IL-2-reseptor</i>	54
5.3	UTPRØVING AV P70 S6K ENZYMASSAY	56
5.3.1	<i>CD4+ celler stimulert via CD3-, CD28- og IL-2-reseptor</i>	56
5.3.2	<i>Ustimulerte PBMC</i>	56
5.3.3	<i>Immunpresipitering av p70 S6K</i>	59
5.3.4	<i>Utpøving i pasientgrupper</i>	60
6	DISKUSJON	62
6.1	GENERELT OM FARMAKODYNAMISK MONITORERING	62
6.2	UTPRØVING AV 4E-BP1 ENZYMASSAY	63
6.3	UTPRØVING AV P70 S6K ASSAY	65
6.4	VEIEN VIDERE	67
7	KONKLUSJON	68
	KILDELISTE	69

Forkortelser

4E-BP1	- 4E-bindende protein 1
ACN	- acetonitril
ADP	- adenosin difosfat
ATP	- adenosin trifosfat
APC	- antigenpresenterende celle
AUC	- arealet under kurven (konsentrasjon vs. tid)
CD	- cluster of differentiation
CD3	- cluster of differentiation 3
CD4	- cluster of differentiation 4
CD4+	- celler som uttrykker CD4
CD28	- cluster of differentiation 28
C _{max}	- maksimal plasmakonsentrasjon
CNI	- kalsineurinhemmer
CYP	- cytokrom P450
DTT	- dithiothreitol
EDTA	- etylendiamintetraeddiksyre
FKBP12	- FK506-bindende protein 12
GFP	- green fluorescent protein (grønt fluoriserende protein)
HDL	- high density lipoprotein

HLA	- human leucocyte antigen (humant leukocytantigen)
HMG-CoA	- 3-hydroksy-3-metylglutaryl-coenzyme A
HPLC	- high performance liquid chromatography
IGF	- insulinlike growth factor
IL-2	- interleukin 2
IL-2R	- interleukin 2-reseptor
IMPDH	- inosinmonofosfat dehydrogenase
IS	- internstandard
LC-MS/MS	- væskekromatografi koplet til tandem massespektrometri
LDL	- low density lipoprotein
m/z	- masse/ladning
MHC	- major histocompatibility complex
mRNA	- messenger ribonukleinsyre
MS	- massespektrometri
mTOR	- mechanistic target of rapamycin
mTORC1	- mechanistic target of rapamycin complex 1
mTORC2	- mechanistic target of rapamycin complex 2
NFAT	- nuclear factor of activated T cells
p70 S6K	- p70 S6 Kinase
PBMC	- peripheral blood mononuclear cells (mononukleære celler i perifert blod)
PBS	- phosphate buffered saline (fosfatbufret saltvann)

PD	- farmakodynamisk
P-gp	- P-glykoprotein
PK	- farmakokinetisk
PMSF	- fenylmetansulfonylfluorid
RLP1	- Randi Larsens peptid 1
RLP2	- Randi Larsens peptid 2
SNP	- single nucleotide polymorphism (enkeltnukleotid-polymorfisme)
$T_{1/2}$	- halveringstid
TCR	- T-celle reseptor
TDM	- therapeutic drug monitoring (terapeutisk legemiddelmonitorering)
TLR	- toll-like reseptorer
T_{\max}	- tid før maksimum konsentrasjon oppnås etter dose
Treg	- regulatoriske T-celler
TR-FRET	- time-resolved fluorescence resonance energy transfer
UV	- ultrafiolett
V_{\max}	- maksimal hastighet av enzymkatalysert reaksjon

Sammendrag

Formålet med dette prosjektet var å finne en metode for farmakodynamisk monitorering av mTOR-hemmere til bruk i kliniske studier blant transplanterte. Det var ønskelig å etablere en metode som var så enkel som mulig. En fordel med farmakodynamisk fremfor farmakokinetisk monitorering, er at man fanger opp konsekvensene av flere typer variasjon som kan påvirke responsen av et legemiddel.

Det ble forsøkt å sette opp to ulike enzymassay, der det ene direkte skulle bestemme aktiviteten av mTOR kompleks 1 og det andre indirekte skulle bestemme aktiviteten via en nedstrøms kinase, p70 S6K. Det ble prøvd ut flere ulike kvantifiseringsmetoder for begge disse. Det viste seg vanskelig å kvantifisere mTOR-aktivitet direkte ved enzymassayet som baserte seg på GFP-4E-BP1 som substrat og kvantifisering av ADP og ATP. Enzymassayet der det ble målt aktivitet av p70 S6K virker derimot lovende. Da kvantifiseringen baserte seg på bestemmelse av reduksjon av et p70 S6K-substrat, ble det observert økt reduksjon ved økt inkuberingstid eller økt cellekonsentrasjon. Ved hjelp av immunpresipitering av kinasen med påfølgende gjennomføring av enzymassayet, har det foreløpig ikke vært vellykket å bevise at det spesifikt er p70 S6K som står for substratreduksjonen.

Videre i dette prosjektet bør man finne en metode der man kan slå fast at det virkelig er p70 S6K som står for reduksjonen av substratet. Dersom dette lykkes, bør metoden prøves ut i pasientgrupper under mer kontrollerte betingelser enn det som er gjort hittil. Det bør undersøkes om det er noen sammenheng mellom aktivitet av p70 S6K og kliniske hendelser.

1 Innledning

1.1 Organtransplantasjon

1.1.1 Generelt om transplantasjon

Transplantasjon kan defineres som overføring av celler, vev eller organer. Overføringen kan skje mellom ulike individer, eller fra et sted til et annet innen samme individ. Når vevet flyttes mellom genetisk ulike individer av samme art, fra donor til resipient, kalles det en allotransplantasjon. Allotransplantasjoner er en viktig behandlingsform for en rekke typer organsvikt, hematologiske sykdommer og noen typer kreft (1).

Alle organtransplantasjoner i Norge utføres ved Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet, og den vanligste typen transplantasjon er nyretransplantasjon. Det ble i 2009 gjennomført 292 nyretransplantasjoner i Norge. Av de transplanterte nyrene var 188 fra døde donorer og 104 fra levende donorer. Andre organer eller vev som transplanteres er lever, stamceller, hjerte, lunger, pankreas og øyceller. For å bedre tilgangen på organer, har de nordiske landene opprettet en samarbeidsorganisasjon som kalles Scandiatransplant. Her registreres vevstypene til alle pasienter som står på venteliste for et organ, og man kan raskt finne en passende resipient til et organ som blir tilgjengelig for transplantasjon (2,3).

1.1.2 Historie

Den første vellykkede nyretransplantasjonen ble utført ved Peter Bent Brigham Hospital i Boston, 1954. Transplantasjonen ble utført mellom to eneggede tvillinger, noe som gjorde at immundempende behandling ikke var nødvendig og at transplantasjonen ble en suksess. Norges første nyretransplantasjon ble gjennomført ved Rikshospitalet allerede to år etter. Imidlertid var donor og resipient hverken i slekt eller hadde samme AB0-blodtype. For å hindre avstøtning ble pasienten bestrålt og gitt store doser kortison. Etter 30 dager døde pasienten på grunn av hjertestans (4).

Den første langvarig vellykkede nyretransplantasjonen i Norge ble utført ved Ullevål sykehus i 1963. Begge pasientens foreldre sa seg villige til å være donorer, og overlege Ole Jacob Malm utførte en tredjemannstest på seg selv for å finne ut hvem av foreldrene som egnet seg best. Han transplanterte en liten hudlapp fra resipienten på sin egen underarm. Da denne ble avstøtt etter omtrent åtte dager, var han immunisert mot pasienten. Deretter transplanterte han en hudlapp fra hver av de potensielle donorene på armen sin. Morens hudlapp ble avstøtt raskere enn farens, og dermed slo Malm fast at pasientens vev lignet mer på morens enn farens. Mor ble valgt som donor. I tillegg til at donor og resipient sannsynligvis hadde bedre vevsforlikelighet enn ved en tilfeldig donor, prøvde man også ut azatioprin i tillegg til glukokortikoider for første gang i Norge. Resultatet ble meget vellykket; pasienten levde i 22 år med den nye nyren, og moren levde til hun ble 92 år gammel (4).

Den første kliniske transplantasjonen av et annet organ enn nyre, var en levertransplantasjon. Denne ble utført i Denver i USA, 1963, men pasienten døde på operasjonsbordet på grunn av blødninger. I Norge ble den første levertransplantasjonen utført ved Ullevål sykehus i 1971. Denne pasienten døde etter 53 dager. Den første levertransplantasjonen med moderne immundempende behandling i Norge, ble utført ved Rikshospitalet i 1984. Pasienten levde i 23 år med sin nye lever (4,5).

1.1.3 Organtransplantasjon og vevsforlikelighet

Den vanligste transplantasjonsformen ved organsvikt er allotransplantasjon. Transplantatet vil da ha alloantigener, som er makromolekyler og varierer innen en art. At mottakeren ikke er tolerant ovenfor alloantigenene, fører til at det settes i gang en immunrespons mot vevet som oppfattes som fremmed (1).

Det finnes mange ulike alloantigener, men *major histocompatibility complex* (MHC)-molekyler har vist seg å spille en særlig viktig rolle i forbindelse med vevsforlikelighet. I mennesker kalles MHC-molekylene for HLA-molekyler, som står for *human leucocyte antigens*, fordi de først ble funnet på leukocytter. De finnes imidlertid også på de fleste andre kjerneholdige celler og spiller en viktig rolle i aktiveringen av T-celler. De er svært polymorfe, noe som gjør at de fleste allotransplantasjoner fører til en immunisering mot fremmed HLA. Dessuten reagerer T-celler godt på HLA-molekyler, da deres naturlige oppgave er å presentere antigener for T-cellene (1,6).

Det finnes to grupper HLA. HLA-klasse I binder og presenterer peptider fra intracellulære proteiner, for eksempel fra virus. HLA-klasse II binder og presenterer peptider fra endocyterte proteiner, for eksempel fra bakterier. HLA-klasse I finnes på nesten alle celler, mens HLA-klasse II kun finnes på antigenpresenterende celler som monocytter, B-celler og dendritiske celler. Dersom de presenterte peptidene oppfattes som fremmede, iverksettes en immunrespons. Dette gjelder både for patogener og for transplantater med alloantigener (6).

For å redusere faren for avstøtningsreaksjoner tilstreber man, for de fleste typer organtransplantasjoner, størst mulig HLA-forlikelighet mellom donor og resipient. Det undersøkes også om resipienten har antistoffer mot donors HLA-molekyler fra eventuell tidligere eksponering. Resipienten kan ikke ha naturlige antistoffer mot donors antigener, da dette kan føre til en hyperakutt avstøtningsreaksjon. Dessuten bør det være en forlikelighet i AB0-systemet. Ved levertransplantasjon kreves det imidlertid ikke at resipient og donor skal ha forlikelige HLA-antigener, da dette ikke ser ut til å ha noen betydelig effekt på utfallet (1,2,7).

1.1.4 Ulike avstøtningsreaksjoner

Gjenkjenning og avstøtning av fremmed vev kan skje på to ulike måter. Direkte eller indirekte allo-gjenkjennelse (*allorecognition*). Direkte allo-gjenkjennelse skjer når donors antigenpresenterende celler presenterer peptider med sine egne HLA-molekyler for mottakers T-celler. Indirekte allogjenkjennelse skjer når en død antigenpresenterende celle fra donor frigjør vesikler med allogene HLA-molekyler som endocytteres av mottakers antigenpresenterende celler. Donors HLA-molekyler kan da degraderes til peptider og presenteres for T-celler ved hjelp av mottakers HLA-molekyler (8).

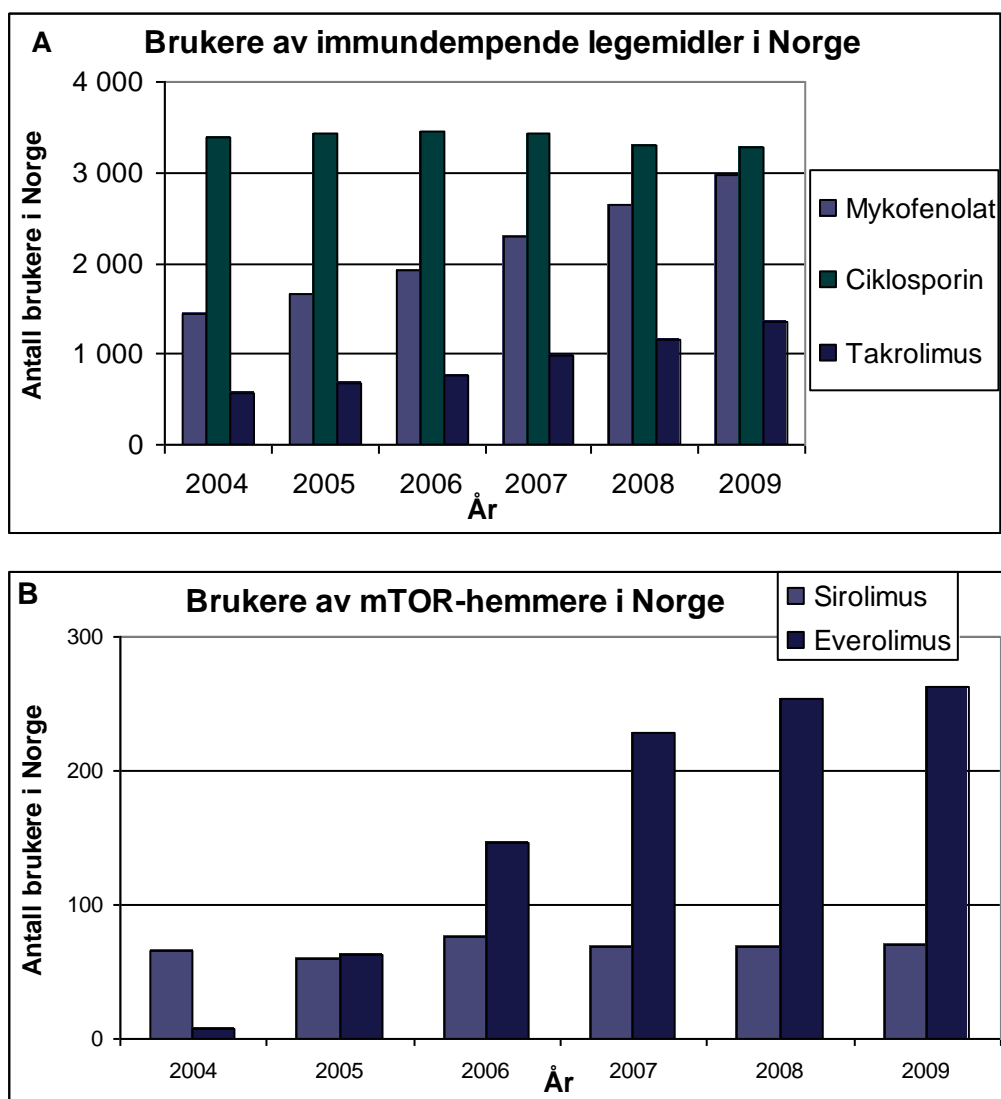
Avstøtningsreaksjoner kan også klassifiseres etter hvor lang tid det tar før de inntreffer i fravær av immunsuppresjon:

- 1 *Hyperakutt avstøtningsreaksjon* inntreffer etter kun minutter til timer etter transplantasjon. Denne typen avstøtningsreaksjon skyldes preformerte antistoffer mot HLA eller naturlig forekommende anti-A og anti-B-antistoffer i AB0-systemet. Antistoffer mot HLA er som regel dannet ved eksponering ved tidligere transplantasjon, graviditet eller blodtransfusjoner. Dersom en mottaker får transplantert et organ med antigener han eller hun allerede har antistoffer mot, vil antistoffene raskt binde seg til endotelceller i transplantatet. Videre vil det oppstå komplementaktivering som fører til endotelskade og okkludering av kar.
- 2 *Akutt avstøtningsreaksjon* utvikles etter 5-7 dager, som er tiden det tar å utvikle en primær anti-allo-HLA-respons hos resipienten. De kliniske tegnene på akutt avstøtning kan som regel ses omtrent to uker etter transplantasjon og skyldes hovedsakelig alloreaktive T-celler. Transplantatet vil avstøtes på samme måte som ved hyperakutt avstøtningsreaksjon. Dersom det benyttes immunsuppresjon, utvikles akutt avstøtningsreaksjon vanligvis fra et par uker til måneder etter transplantasjon, men slike reaksjoner kan også oppstå flere år etterpå dersom den immundempende behandlingen svikter. Dersom det finnes alloreaktive hukommelses T-celler i resipienten ved transplantasjonstidspunktet, kan det utvikles en akselerert akutt avstøtningsreaksjon. Dette kan inntreffe allerede noen få dager etter transplantasjonen, og skyldes at pasienten tidligere har vært utsatt for aktuelle HLA-molekyler.
- 3 *Kronisk avstøtningsreaksjon* oppstår som regel flere måneder eller år etter transplantasjon. Slike reaksjoner ses ofte hos pasienter som har gjennomgått flere akutte avstøtningsreaksjoner, som er blitt slått tilbake med immunsuppresjon. Allikevel har disse ført til vevsskade som kan ses som vevsfibrose og arteriosklerose (1,6).

1.1.5 Immundempende behandling

For å unngå avstøtningsreaksjoner, er det viktig med en god immundempende behandling. I Norge består den immundempende behandlingen vanligvis av en kalsineurinhemmer gitt i kombinasjon med mykofenolat og glukokortikoider. Ved nyretransplantasjon gis det også rutinemessig antistoffer mot interleukin 2-reseptor (IL-2R) (basiliximab) ved operasjon og

etter fire dager. Ved levertransplantasjon gis basiliximab kun til noen grupper pasienter, for eksempel pasienter med nedsatt nyrefunksjon eller høy alder (7,9).



Figur 1. Antall brukere av immundempende legemidler i Norge fra 2004 til 2009. 1A: Antall brukere av mykofenolat, ciklosporin og takrolimus. 1B: Antall brukere av sirolimus og everolimus. Legemidlene kan også brukes ved andre indikasjoner, slik at tallene gjenspeiler ikke nødvendigvis kun deres bruk etter transplantasjon. Data hentet fra reseptregisteret (10).

Ciklosporin A (CsA) var det første legemiddelet på markedet som spesifikt påvirket T-celler. CsA virker ved å hemme aktiviteten av fosfatasen kalsineurin og dermed hindre den i å aktivere *nuclear factor of activated T cells* (NFAT). Dette fører til blokkering av interleukin 2 (IL-2)-syntese og hindrer aktivering, proliferasjon og differensiering av T-celler. Senere er

det kommet enda en kalsineurinhemmer på markedet, takrolimus. Denne blir brukt i stadig større grad ved immundempende behandling i Norge, se figur 1.

Et stort problem med kalsineurinhemmerene er at langtidsbruk av disse gir irreversible skader i nyrevev. Mekanismene bak dette er kun delvis forstått, men man tror at lokal eksponering er viktigere enn systemisk eksponering. Tilleggsfaktorer kan være bruk av *non-steroid anti-inflammatory drugs* (NSAIDs) eller variabilitet i P-glykoprotein og CYP 3A, noe som kan ha betydning for henholdsvis farmakodynamiske- og kinetiske interaksjoner (11). Andre vanlige bivirkninger er hyperlipidemi, hyperglykemi og hypertensjon (12,13).

Mykofenolatmofetil er et produg som omdannes til aktiv mykofenolsyre (MPA) i kroppen. En enterodrasjert formulering av mykofenolatnatrium er også tilgjengelig på markedet. MPA virker ved å hemme enzymet inosinmonofosfat dehydrogenase (IMPDH). IMPDH er et svært viktig enzym i nysyntesen av guanin-nukleotider. T- og B-lymfocytter er sterkt avhengige av nysyntese av guanin for proliferasjon. Andre celler kan rekruttere nukleotidene på andre måter og er i mindre grad avhengige av nysyntese for å prolifere. MPA hemmer dermed proliferasjon av lymfocytter som aktiveres av alloantigener. De vanligste bivirkningene ved bruk av mykofenolat er gastrointestinale og hematologiske bivirkninger (14).

Glukokortikoider virker hovedsakelig via glukokortikoidreseptoren. Glukokortikoider bindes til denne i cytosol, før hele komplekset forflyttes til cellekjernen der det kan bidra til økt eller redusert transkripsjon av ulike gener. Effektene av dette er svært mange. De immundempende effektene henger blant annet sammen med reduserte nivåer av en rekke inflammatoriske cytokiner, enzymer og T-celler. Glukokortikoider kan også gi mange uønskede effekter, som for eksempel utvikling av diabetes mellitus, redistribusjon av kroppsfett, dyslipidemi, høyt blodtrykk og osteoporose. Bivirkningene observeres oftest ved langtidsbehandling (15). Man tilstreber derfor å gradvis redusere eller seponere glukokortikoider hos de fleste pasienter en tid etter transplantasjon (7,9).

Hemmere av *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) er den nyeste gruppen immundempende legemidler som brukes i vedlikeholdsbehandling etter transplantasjon. Denne gruppen består av everolimus og sirolimus. Bruk av mTOR-hemmere bør særlig vurderes i tilfeller der pasienten har hatt kreft eller utvikler det etter en tids bruk av immundempende legemidler (9). De kan også være et godt alternativ for å bedre langtids nyrefunksjon, da det virker som om de er mindre nefrotoksiske enn kalsineurinhemmere. De

kan da brukes av lav-/moderat-risikopasienter i kombinasjon med mykofenolat, steroider og induksjonsbehandling med antistoffer mot IL-2-reseptor eller thymoglobulin (16). Vanlige bivirkninger av mTOR-hemmere er dyslipidemi, anemi, leukopeni og forsinket sårtilheling (17).

1.1.6 Monitorering av immundempende legemidler

Farmakokinetisk monitorering

Farmakokinetikk (PK) kan defineres som kvantifisering av hvor et legemiddel og dets metabolitter befinner seg i kroppen, og utvikling av modeller for dette (18). Man kan også beskrive PK på en enklere måte: ”Hva kroppen gjør med legemiddelet”, med tanke på absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon. Ved PK-monitorering bruker man ofte en surrogatmarkør, som regel predose-konsentrasjon (C_0), for å beskrive legemiddeleksponering uttrykt som arealet under kurven (AUC). Ideelt sett bør disse parameterene korrelere godt, men det er ikke alltid tilfelle. I praksis tilstreber man ofte at C_0 skal ligge innenfor et terapeutisk vindu for legemiddelet (19).

Målet med PK-monitorering er å optimalisere effekten og minimalisere toksisiteten av legemidler. Dette er særlig viktig for immundempende legemidler, da disse ofte kan være svært toksiske ved for høy eksponering, og for lav effekt kan få alvorlige konsekvenser. I tillegg utviser de fleste av disse legemidlene stor inter- og intraindividuell variabilitet og er svært utsatt for interaksjoner med andre legemidler. Imidlertid er det ikke gjort mange randomiserte prospektive studier som evaluerer den kliniske effekten av PK-monitorering for immundempende legemidler. Slike studier er kun gjort for MPA og her var resultatene fra de to store studiene som er gjort motstridende (19-21).

Farmakodynamisk monitorering

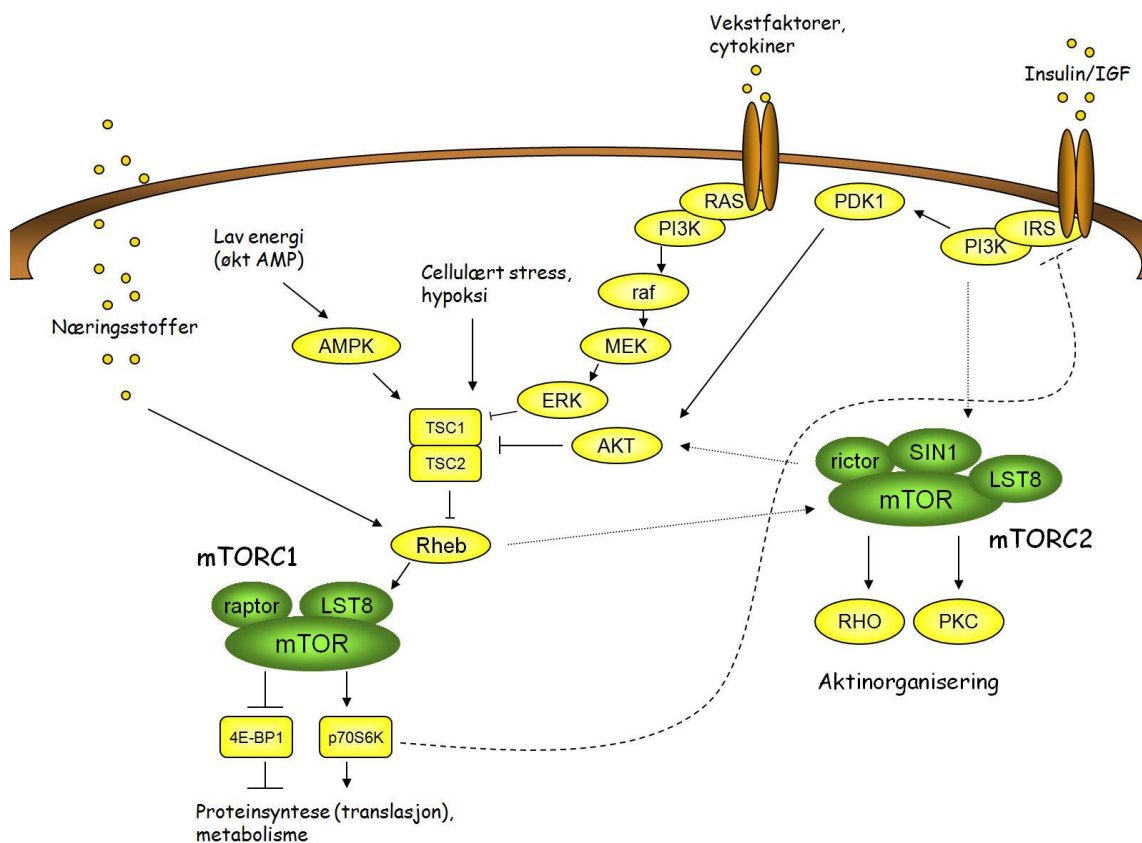
Ved farmakodynamisk (PD) monitorering av et legemiddel kvantifiserer man den biologiske responsen av dette, altså ”hva legemiddelet gjør med kroppen”. Alene eller i kombinasjon med farmakokinetiske målinger kan slike målinger bidra til å optimalisere legemiddelbehandlingen. Når det gjelder immundempende legemidler, er det utviklet metoder for monitorering av generelle PD-markører som reflekterer netto immunsuppresjon. Dette er for eksempel T-lymfocytproliferasjon eller syntese av IL-2 og tumor nekrosefaktor-

alfa (TNF- α). For flere av de immundempende legemidlene, er det også utviklet metoder for PD-monitorering som spesifikt måler aktiviteten av målenzymene. Ingen metoder for legemiddelspesifikk PD-monitorering er enda utviklet for rutinemessig bruk i klinikken (19,22,23).

1.2 mTOR

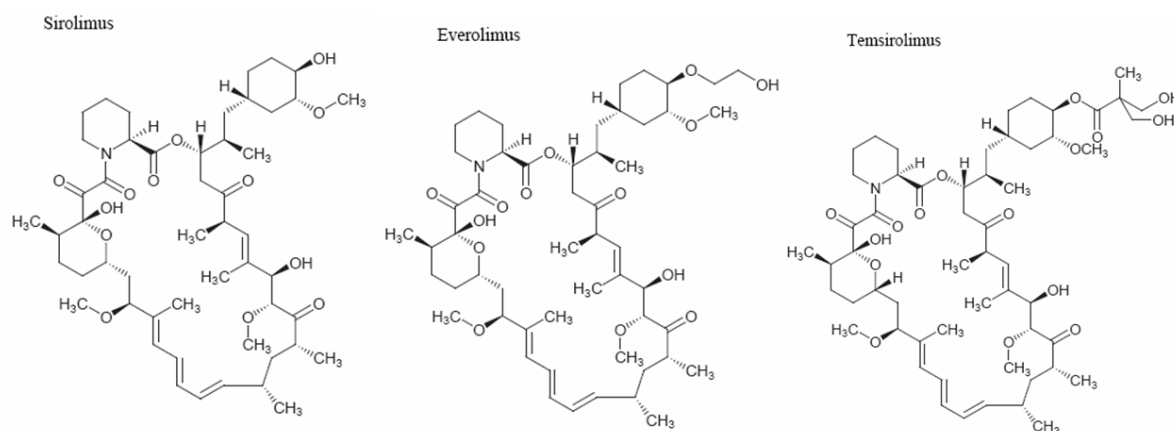
Mechanistic target of rapamycin (mTOR) er en konserverert serin/threonin kinase som kontrollerer cellevekst og metabolisme som en respons på vekstfaktorer, cellulær energi, stress og næringsstoffer. Kinasen ble først oppdaget i gjærceller, men finnes også i alle eukaryote organismer (24). I immunologien har mTOR viktige roller både for medfødt og adaptivt immunforsvar, og regulerer blant annet aktivering og proliferasjon av effektor T-celler, regulatoriske T-celler og profesjonelle antigenpresenterende celler (APCs) (25).

Det finnes to kjente proteinkomplekser i celler der mTOR inngår, se figur 2. Det antas at sirolimus hovedsakelig utøver sin effekt via hemming av mTOR kompleks 1 (mTORC1), som består av mTOR, raptor og mLST8. Rett nedstrøms for mTORC1 ligger kinasene p70 S6K og 4E-BP1 som begge er involvert i translasjon av mRNA. Økt aktivitet av mTORC1 gir økt translasjon og dermed økt proteinsyntese og cellevekst. Signaler fra flere ulike signalveier samordnes av mTORC1. Signaler om høye nivåer av næringsstoffer, vekstfaktorer, insulin og noen cytokiner øker mTORC1s kinaseaktivitet. Signaler om lav cellulær energi eller cellulært stress reduserer kinaseaktiviteten. Det andre proteinkomplekset som inkluderer mTOR, mTORC2, består av mTOR, rictor, SIN1 og mLST8. Det antas at mTORC2 er involvert i organisering av aktin-cytoskjelettet, men man har ikke full forståelse for kompleksets rolle (25,26).



Figur 2. mTORs signalveier. Økte nivåer av næringsstoffer, vekstfaktorer, cytokiner, insulin, og insulin-like growth factor (IGF) øker mTORC1s kinaseaktivitet og fører dermed til økt translasjon av mRNA. Lavt cellulært energinivå, cellulært stress eller mangel på oksygen reduserer mTORC1s kinaseaktivitet. Det finnes også en negativ feedback signalvei fra p70S6K til insulin reseptor substrat (IRS). mTORC2 er antagelig involvert i aktinorganiseringen. Det antas at mTORC2 mottar signaler fra PI3K og Rheb, og sender signaler til Akt, men dette er ikke helt klart (24,25).

1.3 mTOR-hemmere



Figur 3. Strukturer av mTOR-hemmerene sirolimus, everolimus og temsirolimus. Trykket med tillatelse fra Felleskatalogen (27).

Det finnes i dag tre mTOR-hemmere på markedet i Norge. Disse er sirolimus, everolimus og temsirolimus. Sirolimus og everolimus brukes i immundempende behandling etter transplantasjon, mens temsirolimus brukes i kreftbehandling. Everolimus testes også ut mot kreft i kliniske studier (28,29). De tre er strukturelt svært like. Sirolimus og everolimus skiller seg kun fra hverandre ved en hydroksyetylgruppe i 40-posisjon, mens temsirolimus er en ester av sirolimus ved den samme posisjonen (27).

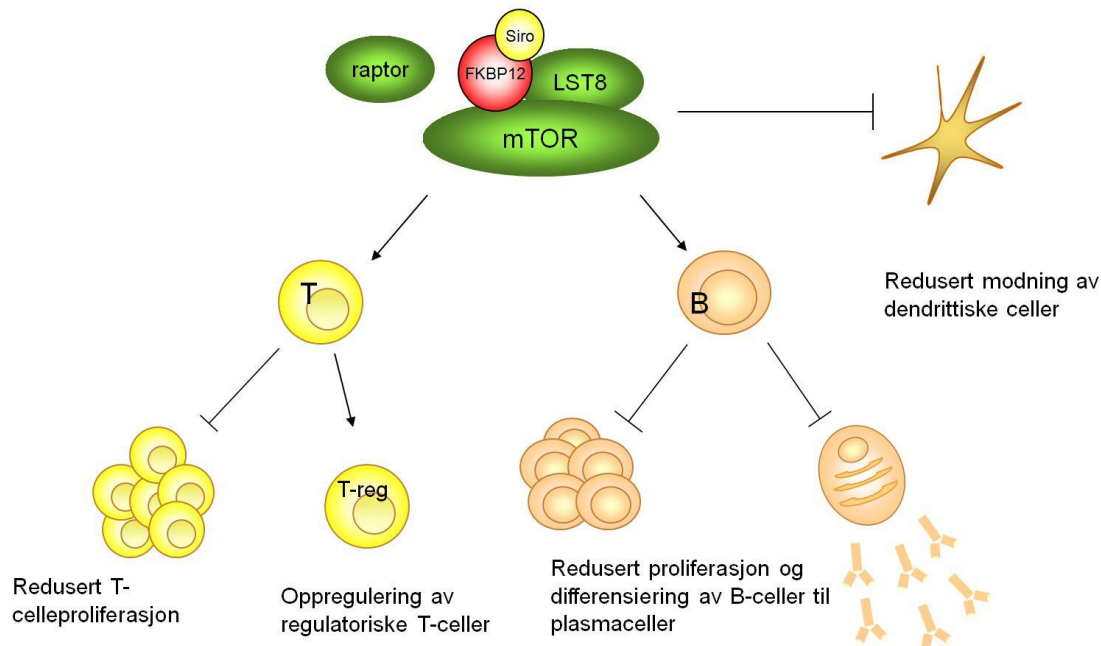
Everolimus ble utviklet for å bedre løselighet og biotilgjengelighet av sirolimus. Da det stort sett er farmakokinetikken som skiller de to fra hverandre, vil denne oppgaven videre ta utgangspunkt i sirolimus, og det vil kommenteres der det er vesentlige forskjeller (30,31).

1.3.1 Generelt om sirolimus

Sirolimus (rapamycin) ble første gang isolert i 1975 fra bakterien *Streptomyces hygroscopicus* som ble funnet i en jordprøve fra Rapa Nui (Påskeøyene). Stoffet ble da identifisert som et antifungalt antibiotikum og ble kalt rapamycin etter funnstedet (32). Sirolimus er et makrosyklisk lakton og ligner strukturelt på kalsineurinhemmeren takrolimus, men virkningsmekanismene til de to legemidlene er ulike. Opprinnelig var sirolimus ment som et supplement til kalsineurinhemmere (CNIs), men brukes i dag heller i CNI-frie regimer (17).

1.3.2 Farmakodynamikk

Sirolimus bindes til FK506-bindende protein 12 (FKBP12) i cytosol før komplekset bindes til mTORC1. Dette fører til at Raptor-proteinet dissosieres fra mTORC1, og kompleksets kinaseaktivitet reduseres (25).



Figur 4. Viktige immunologiske effekter av mTOR-hemmere.

Den mest omtalte effekten av mTOR-hemmere involverer redusert proliferasjon av T-celler, fordi celledyklus stopper opp mellom G₀ og S-fase. Dette er imidlertid ikke den eneste effekten som gjør disse legemidlene effektive i immundepende behandling. Effektene man ser ved inhibering av mTORC1 er mange og involverer både det medfødte og det adaptive immunforsvaret (33). I tillegg til redusert proliferasjon av T-lymfocytter, gir mTOR-hemmere redusert proliferasjon og differensiering av B-lymfocytter til antistoffproduserende plasmaceller (34). mTOR regulerer også funksjon og differensiering av antigenpresenterende celler (APC). Behandling med sirolimus reduserer fagocytose, endocytose og pinocytose, reduserer ekspresjon av antigenopptaksreseptorer og MHC-II-molekyler. Andre effekter av mTOR-hemming er redusert proliferasjon av *natural killer* (NK)-celler og redusert kjemotakse av nøytrofile granulocytter (25).

Man kan også finne mTOR i ikke-prolifererende celler som makrofager og dendritiske celler i det medfødte immunsystemet. Det er vist at mTOR også kan bidra i regulering av signaler

fra Toll-like reseptorer (TLR). TLR er en gruppe reseptorer i det medfødte immunsystemet som blant annet binder makromolekylære strukturer som finnes i patogener, men ikke i humane celler. Slike strukturer kan for eksempel være lipopolysakkarid (LPS), peptidoglycan eller dobbelttrådet RNA (8,33).

Regulatoriske T-celler er en subpopulasjon av CD4⁺ celler som påvirkes av sirolimus. De kalles ofte CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatoriske T-celler eller Tregs. Disse kan undertrykke aktiviteten av effektor T-celler, B-celler, monocytter og denrittiske celler. I transplantasjonssammenheng er Tregs spesielt interessante, da det er mulig at de kan bidra til en spesifikk toleranse ovenfor et transplantert organ. Flere studier har vist at sirolimus positivt påvirker funksjonen av og antall Tregs (35).

1.3.3 Farmakokinetikk

Absorpsjon

Absorpsjon av sirolimus fra tarm skjer relativt rask og C_{\max} inntreffer etter 1-2 timer (36,37). Biotilgjengeligheten er relativt lav, men det er vanskelig å finne gode tall på dette. I de fleste studiene er sirolimus gitt i kombinasjon med ciklosporin, noe som kan påvirke biotilgjengeligheten. I rotter er den funnet å være 10 prosent (38). Ved samtidig inntak av et fettriikt måltid øker $AUC_{0-\infty}$, og det er derfor anbefalt å ta legemiddelet konsekvent med eller uten mat (39).

Distribusjon

Sirolimus fordeles i stor grad til røde blodceller, og har en blod/plasma-ratio på 38 hos immunsupprimerte transplanterte pasienter (36). Hos friske frivillige er det imidlertid funnet en blod/plasma-ratio på 142 ved administrering av en enkeltdose. Denne er høyere enn den som er funnet i de fleste andre studier. Dette kan skyldes at de fleste studiene er gjennomført blant stabile nyretransplanterte pasienter. Sirolimus gir ofte hyperlipidemi, noe som kan endre denne fordelingen og gi lavere blod/plasma-ratio (37).

Eliminasjon

Sirolimus er substrat for CYP 3A4/5-enzymene og P-glykoprotein (P-gp). De viktigste metabolismeveiene er O-demetylering og hydroksylering. Den immundempende aktiviteten

av metabolittene antas å være lav (17,40). Etter gjentatte perorale doser er den gjennomsnittlige halveringstiden 62 timer og ca. 90 prosent av administrert legemiddel kan gjenfinnes i fæces, hovedsakelig som metabolitter (36,37).

1.3.4 TDM (terapeutisk legemiddelmonitorering)

I likhet med andre immundempende legemidler, har også sirolimus et smalt terapeutisk vindu, og utviser stor inter- og intraindividuell farmakokinetisk variabilitet. Det er derfor anbefalt å dosere legemidlet ved hjelp av blodkonsentrasjonsmålinger (17).

Vanligvis gis en startdose på 6 mg så tidlig som mulig etter transplantasjon. Deretter gir man 2 mg daglig, før dosen bør justeres etter konsentrasjonsmålinger i fullblod. Dersom sirolimus administreres sammen med ciklosporin, bør man tilstrebe en minimumskonsentrasjon i fullblod mellom 4 og 12 ng/mL. Ciklosporin bør seponeres gradvis og sirolimuskonsentrasjonen oppjusteres til 12-20 ng/mL. Alle verdiene ovenfor gjelder konsentrasjoner målt ved kromatografiske metoder (41). Immunoassay-metoder gir høyere verdier enn kromatografiske metoder på grunn av kryssreaktivitet med inaktive metabolitter. (42,43). Samtidig administrering av ciklosporin og sirolimus over lengre tid enn tre måneder bør unngås, da det er observert at nyrefunksjonen kan forverres mer enn når det kun gis fulldose ciklosporin (17).

Når det gjelder everolimus, bør man gi en startdose på 0,75 mg to ganger daglig i kombinasjon med ciklosporin. Ciklosporindosen bør reduseres etter hvert, men behøver i følge produsenten ikke seponeres fullstendig som for sirolimus-regimer (44). Så snart det er mulig bør everolimus monitoreres og doseres etter blodkonsentrasjonsmålinger. Et foreslått terapeutisk vindu for predosekonsentrasjon er 3-8 ng/mL (45).

1.3.5 Genetikk

Sirolimus er substrat for CYP 3A-enzymet og transportproteinet P-gp. Det er derfor undersøkt om mutasjoner i gener som koder for disse påvirker kinetikken til sirolimus. Det er vist at pasienter som uttrykker CYP 3A5 (*1/*1 eller *1/*3) trenger høyere dose for å oppnå samme blodkonsentrasjon som bærere av CYP 3A5 *3/*3 (46,47). Andre studier har ikke greid å påvise en slik sammenheng (48). Både Anglicheau *et al.* og Mourad *et al.* undersøkte

også sammenhengen mellom farmakokinetikk og enkelt nukleotid-polymorfismer (SNPs) i genet som koder for P-gp (*ABCB1*). De fant ingen sammenheng mellom konsentrasjon/dose-ratio og SNPs. Det trengs flere studier for å kunne beskrive eventuelle sammenhenger mellom farmakokinetikk og farmakogenetikk for sirolimus.

1.3.6 Interaksjoner

Da sirolimus er substrat for CYP 3A4 og P-gp i blant annet tarm og lever, påvirkes kinetikken av legemidler som hemmer eller induserer disse proteinene. Ved samtidig peroral administrering av ciklosporin og sirolimus øker biotilgjengeligheten av sirolimus. Dette kan skyldes at ciklosporin hemmer CYP 3A og/eller P-gp, eller det kan skyldes substratkonkurranse mellom legemidlene. Det anbefales derfor å ta legemidlene med fire timers mellomrom (49-51).

Det er også foreslått at legemidlene kan interagere ved konkurranse og/eller hemming av CYP 3A4 og P-gp i distribusjon-, metabolisme- og eliminasjonsfase. Ved samtidig bruk av ciklosporin og sirolimus er det indikasjoner på at ciklosporinkonsentrasjonen øker lokalt i nyrevev (52). Dette kan bidra til økt nefrotoksisitet og kan forklare økte serum-kreatininverdier og redusert GFR som er observert ved samtidig bruk av sirolimus og ciklosporin (51,53).

Andre CYP 3A4-hemmere som øker AUC for sirolimus er ketokonazol, vorikonazol, diltiazem, verapamil, erytromycin og grapefruktjuice. CYP 3A4-indusere som reduserer sirolimus-AUC er for eksempel rifampicin, karbamazepin, fenytoin, fenobarbital og johannesurt. Hemmere av P-gp kan redusere efflux av sirolimus til tarmlumen og øke sirolimusnivå i blod. Pasienter som behandles med legemidler som påvirker CYP 3A4 eller P-gp bør monitoreres nøye (17,42).

1.3.7 Bivirkninger

Som alle immundepende legemidler øker sirolimus risikoen for infeksjoner. Signalveien via mTOR er felles for mange typer celler, og inhibering av denne kan derfor gi bivirkninger i ulike vev. Sirolimus har en annen bivirkningsprofil enn andre immundepende legemidler.

Vanlige bivirkninger av sirolimus er dyslipidemi, trombocytopeni, leukopeni, anemi, pneumonier og forsinket sårtilheling (16,17).

Dyslipidemi er en vanlig bivirkning ved sirolimusbehandling. Man har observert økte nivåer av triglyserider og kolesterol, men på tross av dette er det ikke observert høyere forekomst av kardiovaskulær sykdom hos pasienter behandlet med sirolimus. Dette kan skyldes at sirolimus har en anti-proliferativ effekt på vaskulær glatt muskulatur, noe som kan redusere faren for arterielle skader. Det kan derfor være at sirolimusindusert hyperlipidemi ikke er like farlig som tilsvarende hyperlipidemi forårsaket av andre faktorer (54).

1.3.8 mTOR-hemmere og kreft

Behandling med immundempende legemidler øker faren for å utvikle maligne sykdommer. Totalt sett har immunsupprimerte transplanterte pasienter 3-4 ganger høyere risiko for å utvikle kreft i forhold til normalbefolkningen. De vanligste krefttypene blant denne populasjonen er kreft i hud og lepper, post-transplantasjon lymfoproliferative sykdommer (PTLD), Kaposi sarkom og renale carcinomer (55).

Flere studier har vist at mTOR-hemmere i tillegg til å inneha en immundempende effekt, også reduserer risikoen for å utvikle kreft. En studie sammenlignet insidensen av *de novo* malignitet hos 33 249 transplanterte pasienter over 963 dager. Pasienter som brukte sirolimus eller everolimus, enten i kombinasjon med CNIs eller alene, hadde signifikant lavere insidens i forhold til pasienter som ikke brukte mTOR-hemmere (56). I tillegg til redusert proliferasjon, tror man at mekanismen bak denne effekten kan være at mTOR-hemmere reduserer nivåer av cytokinene *vascular endothelial growth factor-A* (VEGF-A) og *transforming growth factor β 1* (TGF- β 1), som blant annet er viktige for angiogenese (57).

1.3.9 Ulikheter mellom sirolimus og everolimus

Everolimus ble utviklet for å ha bedre løselighet enn sirolimus og har også høyere oral biotilgjengelighet enn sirolimus, henholdsvis 16 og 10 prosent (38). Dette skyldes antageligvis at everolimus absorberes raskere fra tarm. Når ciklosporin og everolimus administreres samtidig, øker eksponeringen av everolimus. Everolimus sin halveringstid er vesentlig kortere enn for sirolimus, og er funnet å være gjennomsnittlig 28 timer. Derfor

doseres legemiddelet to ganger daglig og kan gis samtidig som ciklosporin, som også doseres to ganger daglig (38,58).

Fettrike måltider påvirker også absorpsjonen av everolimus. Men i motsetning til hva som er tilfelle for sirolimus, så reduseres everolimus AUC ved samtidig inntak av fettrikt måltid. Det anbefales derfor at også everolimus administreres konsekvent med eller uten mat for å redusere variabilitet i absorpsjon (59).

1.4 Bakgrunn for metode

1.4.1 Metodeutvikling

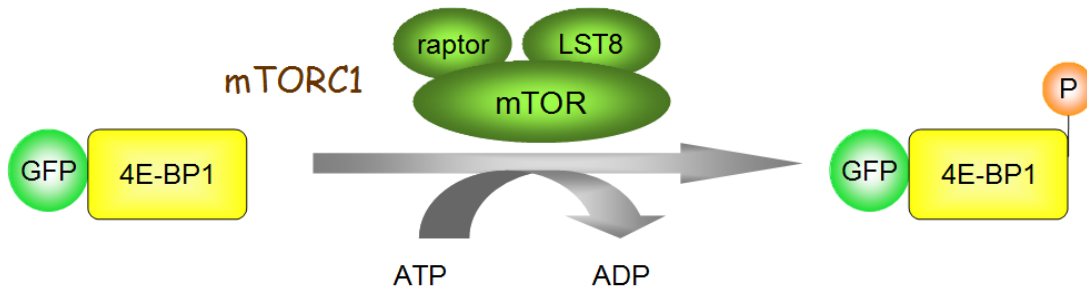
Det finnes både flere kommersielt tilgjengelige kits og andre publiserte metoder for direkte eller indirekte bestemmelse av mTOR-aktivitet. De fleste av disse er ikke utviklet for bruk i klinisk sammenheng. Mange bruker antistoffbaserte metoder, som kan brukes for eksempel til å kvantifisere fosforylert p70 S6K. Andre metoder innebærer immunpresipitering av mTOR eller p70 S6K, og de fleste metodene baserer seg på kvantifisering ved hjelp av luminescens eller fluorescens.

I dette prosjektet var målsettingen å finne en enklere metode som krever mindre ressurser i form av arbeidstid og kostnader. Dette er relevant med hensyn til praktisk gjennomførbarhet av studier i pasientpopulasjoner. Det ble derfor først undersøkt om det var mulig å bruke ustimulerte PBMC, for deretter å bestemme enzymaktiviteten direkte i cellelysater fra disse. Det var også ønskelig å kunne bruke kromatografiske metoder i kvantifiseringen.

1.4.2 GFP-4E-BP1-enzymassay

Det ble tatt utgangspunkt i en metode som er utviklet for å måle mTOR- kinase aktivitet i rene løsninger, dvs. ikke cellelysater (LanthaScreen™ Kinase assay for FRAP1 (mTOR), Invitrogen, Carlsbad, CA). 4E-BP1 er et endogent substrat for mTORC1, se avsnitt 1.2 om mTOR). 4E-BP1 var ikke tilgjengelig, men GFP-4E-BP1 er identisk med dette, bortsett fra at det er koplet på et grønt fluoriserende protein (GFP) som kan brukes til deteksjon ved *time-resolved fluorescence resonance energy transfer* (TR-FRET) (60).

Det var ønskelig å finne en relativt billig og enkel kvantifiseringsmetode. Det ble derfor forsøkt å sette opp et enzymassay ved å bruke GFP-4E-BP1 som substrat, og kvantifisere fosforyleringshastigheten ved hjelp av HPLC-UV og luminescens.



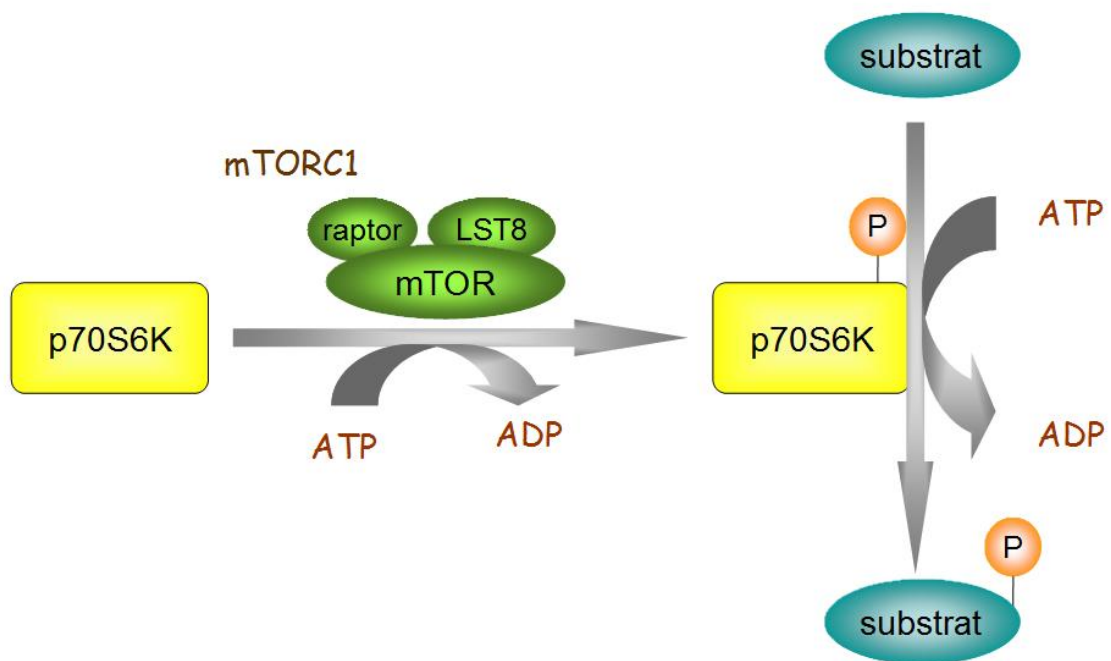
Figur 5. *mTORC1* fosforylerer 4E-BP1.

mTORC1 fosforylerer GFP-4E-BP1 via en ATP-avhengig reaksjon, se figur 5. For hver fosforylering forbrukes ett adenosintrifosfat (ATP) og det dannes ett adenosindifosfat (ADP)-molekyl. Det ble derfor forsøkt å kvantifisere fosforyleringshastigheten ved å måle konsentrasjoner av ATP og ADP.

1.4.3 p70 S6 Kinase-assay

p70 S6K er en direkte nedstrøms kinase for mTORC1, se avsnitt 1.2 om mTOR. Denne kinasen er av flere foreslått som en passende markør for å monitorere effekten av mTOR-hemmere. Peralba et al (61) har brukt et slikt assay for å bestemme den farmakodynamiske effekten av temsirolimus (CCI-779) som er en mTOR-hemmer som brukes i kreftbehandling. De fant at det var en lineær sammenheng mellom reduksjon i p70 S6K-aktivitet og tiden det tok før man observerte tumorprogresjon i ni pasienter med kreft fra nyreceller. Det er mulig at p70 S6K-aktivitet også kan være en god markør for effekt av mTOR-hemmere brukt for å hindre rejeksjon etter transplantasjon.

Substratet som ble benyttet i enzymassayet er et peptid som er en del av p70 S6Ks endogene substrat (Upstate, Lake Placid, NY). For å bestemme aktiviteten av p70 S6K ble det både forsøkt å kvantifisere substratet ved LC-MS/MS og ATP/ADP ved HPLC-UV.



Figur 6. p70 S6K fosforyleses av mTORC1 i en ATP-avhengig reaksjon. Fosforylert p70 S6K fosforilerer substratet via en ny ATP-avhengig reaksjon som kan hastighetsbestemmes ved å kvantifisere substratet.

2 Hensikt

Hensikten med dette prosjektet er å finne en metode for farmakodynamisk monitorering av mTOR-hemmere. Metoden er tenkt brukt i studier sammen med farmakokinetiske målinger.

Det finnes allerede noen metoder for dette, men disse er relativt tidkrevende og kostbare, og kun få av dem er tilpasset bruk i klinisk sammenheng. For oss var det ønskelig å etablere en metode som enkelt kan benyttes i studier for å prøve å finne en sammenheng mellom farmakodynamikk, farmakokinetikk og aller helst klinisk utfall.

Immundempende legemidler har smale terapeutiske vinduer og kan være svært toksiske ved overeksponering. Det er heller ikke ønskelig med for lav eksponering, da dette kan føre til reaksjonsepisoder.

Når det gjelder mTOR-hemmerene er det observert at farmakokinetikk og -dynamikk ikke nødvendigvis samsvarer så godt (62). Det kan derfor være at en bestemt konsentrasjon gir optimal immunsuppresjon hos en pasient, men at den hos andre vil gi for liten eller stor effekt. Dette kan påvirkes av både arvelige faktorer og miljøfaktorer. Det er derfor ønskelig med metoder som kan si noe direkte om effekten av legemiddelet. Det ideelle hadde vært om man kunne brukt farmakodynamiske målinger til å beskrive hver enkelt pasients effekt og dosebehov av et legemiddel.

3 Materialer

3.1 Utstyr

Beskrivelse	Navn	Produsent
Anionbytte-kolonne	Hypersil NH2 (APS-2) (3 μm ; 150 \times 4.6 mm)	Phenomenex, Torrance, CA
Celleteller	Z1 Coulter Particle Counter	Beckman Coulter, Brea, CA
EDTA-rør	Vacurette K2E K ₂ EDTA, 4 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Østerrike
Gradient-sentrifugerør	BD Vacutainer CPT Sodium Heparin, 8 mL	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
HILIC-forkolonne	Atlantis HILIC 3 μm , 2,1 \times 10 mm	Waters, Manchester, UK
HILIC-kolonne	Atlantis HILIC 3 μm , 2,1 \times 50 mm	Waters, Manchester, UK
HPLC-MS/MS	Waters 2795 Separations Module, Waters Quattro micro API	Waters, Manchester, UK
HPLC-UV	Hewlett Packard Series 1100	Agilent Technologies, Santa Clara, CA
Inkubatorskap	Queue 2720	Leverandør: Heigar, Oslo, Norge
Kjølesentrifuge	Kubota 8700	Kubota Corporation, Tokyo, Japan
Magneter	Dynal MPC-S/MPS-L	Invitrogen, Carlsbad, CA
Omvendtphase-kolonne	Cromolith Performance RP-18e (100 \times 4,6 mm)	Merck KgaA, Darmstadt, Tyskland
Plateleser	Wallac 1420 Victor ² Multilabel Counter	PerkinElmer, Waltham, MA

Platerister	Wallac 1296-001 Delfia Plateshake	PerkinElmer, Waltham, MA
Polypropylenrør med lav proteinbinding	Protein LoBind Tube 0,5 mL og 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg, Tyskland
Rulle med tilting	Boule Mixer 820	Boule Diagnostics Int AB, Stockholm, Sverige
Sentrifuge til mikrosentrifugerør	Jouan BR4i	Thermo Scientific, Waltham, MA
Sentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus instruments, Hanau, Tyskland
Sentrifugerør	Falcon, 14 mL Polystyrene Round-Bottom Tube	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
Software til HPLC	EZChrome Elite	Agilent, Santa Clara CA
Software til LC-MS/MS	MassLynx	Waters, Manchester, UK
Ultralydbad	Branson 1210	Branson, Danbury, CT
Vannbad	Grant OLS 200	Grant, Cambridge, Storbritannia
Vekt	Mettler AE 200	Mettler Toledo, Oslo, Norge
Vorteksmikser	Vortex Genie 2	Scientific Industries INC, Bohemia, NY

3.2 Reagenser

Beskrivelse	Navn	Produsent
Acetonitril (ACN)	Acetonitrile HPLC Grade S	Rathburn Chemicals Ltd, Walkerburn, Skotland
ADP tørrstoff	Adenosine 5'-diphosphate sodium salt	Sigma-aldrich, St. Louis, MO
Aktiveringskuler	Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	Invitrogen, Carlsbad, CA
Antistoff, normal rabbit IgG	Normal Rabbit IgG (12-370)	Millipore, Billerica, MA
Antistoff mot p70 S6K	Anti-p70 S6 Kinase 200 µg (07-402)	Millipore, Billerica, MA
ATP tørrstoff	Adenosine 5'-triphosphate disodium salt	Sigma-aldrich, St. Louis, MO
ATP stamløsning	10 mM ATP	Invitrogen, Carlsbad, CA
Avkoplingsreagens	DETACHaBEAD CD4	Invitrogen, Carlsbad, CA
Binde-/vaskebuffer	Ab. Binding & Washing Buffer, fra Immunoprecipitation Kit® Protein G	Invitrogen, Carlsbad, CA
BSA	Albumin solution from bovine serum	Sigma-aldrich, St. Louis, MO
Celleekstraksjonsbuffer I	Cell Extraction Buffer (FN0011)	Invitrogen, Carlsbad, CA
Cellelyseringsvæske	ATPLite; Mammalian Cell Lysis Solution	PerkinElmer, Shelton, CT
Dikalium-hydrogenfosfat	Di-kaliumhydrogen phosphat- 2-hydrat, (min 99%)	E. Merck, Darmstadt, Tyskland
Dithiothreitol (DTT)	DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

Elueringsbuffer	Elution buffer, fra Immunoprecipitation Kit® Protein G	Invitrogen, Carlsbad, CA
FBS	Foetal bovine serum (USDA Country of Origin)	Lonza, Verviers, Belgia
Fosfatasehemmer	Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 (P2850)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
GFP-4E-BP1	GFP-4E-BP1 ~20 µM	Invitrogen, Carlsbad, CA
Insulin	Insulin solution, human. 10 mg/mL in 25 mM HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Interleukin 2 (IL-2)	Interleukin-2, recombinant	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Ionebyttet, filtrert vann	Vannrensesystem: Milli-Q ultrapure water	Millipore, Billerica, MA
Isoleringskuler for CD4+ celler	Dynal CD4 Positive Isolation Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA
Isoton væske til celletelling	Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter, Brea, CA
Kaliumdihydrogenfosfat	Potassium dihydrogen phosphate (min 99,5 %)	Prolabo VWR International, West Chester, PA
Kaliumklorid (KCl)	Potassium chloride (min 99,5 %)	Prolabo VWR International, West Chester, PA
Kinasebuffer I	1X FRAP (mTOR) Assay Buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA
Luciferase-substratløsning	ATPlite; Lyophilized Substrate Solution	PerkinElmer, Shelton, CT
Luciferase-substratbuffer	ATPlite; Substrate Buffer Solution	PerkinElmer, Shelton, CT
Magnetkuler med protein G	Dynabeads® Protein G, fra Immunoprecipitation Kit® Protein G	Invitrogen, Carlsbad, CA
Maursyre	Formic acid, eluent additive for LC-MS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

PBS	PBS, BioWhittaker	Lonza, Verviers, Belgia
Penicillin-streptomycin	Penicillin-Streptomycin Mixture, 10K/10K	Lonza, Verviers, Belgia
Perklorsyre, konsentrert	Perchloric acid 70 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
PMSF	(PMSF) Phenylmethanesulfonyl fluoride	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Proteasehemmer	Protease Inhibitor Cocktail (P8340)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Proteasehemmercocktail	Protease Inhibitor Coctail (P2714)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
RLP1	RLP1 (KKRNRTTK)	GenScript, Piscataway, NJ
RLP2	RLP2 (KKRNRTLTK)	GenScript, Piscataway, NJ
RPMI 1640	RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
S6K-buffer	Assay Dilution Buffer I (ADBI)	Upstate, Lake Placid, NY
S6K-substrat (500 µM)	S6 Kinase/Rsk2 Substrate Peptide 2 (KKRNRTLTK)	Upstate, Lake Placid, NY
S6K inhibitor cocktail	Inhibitor cocktail	Upstate, Lake Placid, NY
S6K ATP-løsning	MgAc/ATP Cocktail	Upstate, Lake Placid, NY
Vaskebuffer	Washing buffer, fra Immunoprecipitation Kit® Protein G	Invitrogen, Carlsbad, CA
X-Vivo	X-VIVO 15 w/o Gentamicin or Phenol Red	Lonza, Verviers, Belgia

4 Metoder

4.1 Celleisolering og stimulering

4.1.1 Isolering av mononukleære celler fra blod (PBMC)

Blod ble tappet i gradient-sentrifugerør. Der ikke annet er spesifisert i teksten, er blodet tatt fra friske frivillige. Det ble tatt utgangspunkt i produktbeskrivelsen for rørene da de mononukleære cellene skulle isoleres. Etter tapping av 8 mL blod, ble rørene vendt forsiktig 8-10 ganger og sentrifugert ved 1600-1700 g i 20 minutter ved 4 °C. Ulike blodkomponenter ble da separert etter tetthet. Erytrocytter og nøytrofile granulocytter passerte gjennom gelen ved sentrifugering, mens mononukleære celler lå i et hvitt lag over gelen. Øverst lå et lag med plasma, som blant annet inneholdt blodplater. De mononukleære cellene ble tatt ut med en pipette, og overført til et sentrifugerør. For å vaske ut blodplater og proteiner, ble det tilsatt 5 mL PBS og blandet lett. Røret ble deretter sentrifugert ved 300 g i 15 minutter ved romtemperatur. Supernatanten ble fjernet og pelleten resuspendert i 2,5 mL PBS. Røret ble sentrifugert ved samme betingelser en gang til og supernatanten fjernet. Cellepelletten ble resuspendert i ulike cellemedium (X-vivo, RPMI 1640 eller PBS), avhengig av hvilket forsøk som skulle gjøres. Celler som skulle brukes ustimulerte i videre forsøk, ble etter telling lagret ved -70 °C i 0,5 mL sentrifugerør med lav proteinbinding.

4.1.2 Isolering av CD4+ celler

CD4+ celler ble isolert fra fullblod etter produsentens prosedyre for monodisperse magnetkuler med antistoffer mot CD4.

Vask av kuler

Kulene ble resuspendert ved vorteksmiksing, før det ble overført 12 µL kulesuspensjon per mL blod og 10 µL overskudd til et 1,5 mL polypropylenrør med lav proteinbinding. CD4-buffer 1 (PBS u/Ca²⁺ og Mg²⁺ m/0,1 % BSA) ble tilsatt i forholdet 1:1 og blandet. Deretter

ble røret satt på magnet i ett minutt og supernatanten kastet. Kulene ble til slutt resuspendert i CD4-buffer 1 i likt volum som det opprinnelige uttaksvolumet.

Celleisolering

Rør (4 mL) med EDTA-fullblod ble avkjølt til 2-8 °C. Det ble tilsatt 48 µL isoleringskuler for CD4+ celler, og røret ble vendt seks ganger. Deretter ble røret lagt på en rulle med tilting i 20 minutter ved 2-8 °C, før det ble satt på magnet i to minutter. Supernatanten ble kastet. Kulene, som nå var bundet til CD4+ celler, ble vasket ved å repetere følgende prosedyre tre ganger: Kulene ble tilsatt 2 mL CD4-buffer 1, satt på magnet i ett minutt og supernatanten kastet. Etter vask ble kulene resuspendert i 400 µL CD4-buffer 2 (RPMI 1640 m/1 % FCS).

Frakopling av magnetkuler

Det ble tilsatt 20 µL frakoplingsreagens og røret ble lagt på en rulle med tilting i 45 minutter ved romtemperatur, før det ble satt på magnet i ett minutt. Supernatanten, som nå inneholdt en suspensjon av CD4+ celler, ble overført til et nytt reagensrør. Kulene ble vasket med 500 µL CD4-buffer 2 og supernatanten ble overført til cellesuspensjonen. Deretter ble cellesuspensjonen tilsatt 4 mL CD4-buffer 2 og sentrifugert ved 400 g i 6 minutter. Supernatanten ble kastet, og cellepelletten ble resuspendert i ulike medium avhengig av hva cellene skulle brukes til. CD4+ cellene ble talt, og deretter fortynnet til 800 000 celler/mL i CD4-medium (RPMI 1640 med L-Glutamin, 10 % FBS og 100 U/ml penicillin/streptomycin).

4.1.3 Telling av isolerte celler

Celler ble talt ved hjelp av en automatisert celleteller (Z1 Coulter Particle Counter, Beckman Coulter, Brea, CA). Et cellesuspensjonsvolum på 50 µL ble fortynnet med 19,0 mL isoton væske i en tellekopp. Celletelleren ble innstilt på telling av celler i størrelsesområdet 5-15 µm. Fortynningsfaktor 381 ble satt for å angi cellekonsentrasjonen i den opprinnelige suspensjonen.

4.1.4 Immunpresipitering av p70 S6 Kinase

Immunpresipiteringen ble gjort etter en modifisert prosedyre for Dynalkuler med protein G.

Lysering av celler

Isolerte PBMC ble overført til to 1,5 mL polypropylenrør med lav proteinbinding for isolering av henholdsvis p70 S6K og uspesifikke antigener (negativ kontroll). Rørene ble sentrifugert ved 1150 g i 3 minutter ved 4 °C og supernatanten ble fjernet. Cellepelletten ble resuspendert i 500 µL celleekstraksjonsbuffer og vortekset i 5 sekunder.

Celleekstraksjonsbufferen ble laget like før bruk ved å tilsette 7,2 µL fenylmetansulfonylfluorid (PMSF) (0,3 M) og 100 µL proteasehemmercocktail til 2,0 mL celleekstraksjonsbuffer I. Lyseringen ble utført ved inkubering på is i 30 minutter og 5 sekunder vorteksing ved 10, 20 og 30 minutter. Deretter ble rørene sentrifugert ved 15 870 g i 10 minutter ved 4 °C (Jouan BR4i sentrifuge). Det klare cellelysatsatet ble brukt videre.

Binding av antistoffer til magnetkuler

Magnetkuler med protein G ble resuspendert ved forsiktig pipettering og 50 µL ble overført til to 1,5 mL polypropylenrør med lav proteinbinding. Rørene ble satt på magnet og supernatanten fjernet. Kulene ble resuspendert i 200 µL binde-/vaskebuffer og 4 µL antistoffløsning 1,0 µg/µL, henholdsvis anti-p70 S6K og normal rabbit IgG ble tilsatt.

Rørene ble deretter lagt på en rulle med tilting i 10 minutter ved romtemperatur, plassert på magnet og supernatanten fjernet. Kulene, som nå hadde bundet antistoffer, ble resuspendert i 200 µL binde-/vaskebuffer.

Immunpresipitering av antigen

Rørene som inneholdt kuler med antistoffer ble satt på magnet og supernatanten fjernet. Kulene ble resuspendert i 475 µL cellelysatsat (se over), og inkubert på rulle med tilting i 60 minutter ved 4 °C. Deretter ble røret plassert på magnet og supernatanten fjernet. Kulene, som nå har bundet til seg antigen, ble vasket tre ganger med 200 µL vaskebuffer og til slutt resuspendert i 100 µL vaskebuffer, og overført til 0,5 mL polypropylenrør med lav proteinbinding.

Eluering av antigen

Kulene med antigen ble plassert på magnet og supernatanten fjernet. Kulene ble resuspendert i 20 µL elueringsbuffer og inkubert 2 minutter ved forsiktig pipettering i romtemperatur. Rørene ble plassert på magnet og 15 µL av supernatanten, som nå inneholdt antigener, ble

overført til nye 0,5 mL polypropylenrør med lav proteinbinding, før det ble tilsatt 15 µL S6K-buffer og vortekset i 5 sekunder.

4.1.5 Stimulering av PBMC

Det er tidligere beskrevet at 15 minutters stimulering av PBMC med insulin in vitro, kan øke nivået av fosforylert p70 S6K (63). p70 S6K er en kinase som fosforyleres av mTORC1, og det ble derfor forsøkt å bruke insulin som stimulant for å øke aktiviteten av mTORC1 og dermed hastigheten på fosforyleringen av GFP-4E-BP1.

Isolerte PBMC ble fortynnet til $1,0 \times 10^6$ celler/mL. Et volum på 90 µL av dette ble overført til brønner på et 96 brønners brett, og cellene ble preinkubert ved 37 °C, 5 % CO₂ og høy luftfuktighet, generert ved fordamping fra 1 L sterilt vann i kar, i 2 timer. Det ble deretter tilsatt 60 µL insulin løst i X-Vivo eller RPMI 1640. Ulike celledyrkningsmedium ble utprøvd; X-Vivo, RPMI 1640 og RPMI 1640 med 10 % føtalt kalveserum (FCS). Insulin ble utprøvd med sluttkonsentrasjoner i området 0-100 µg/mL. Etter tilsetning av insulin ble cellene inkubert ved 37 °C, 5 % CO₂ og høy luftfuktighet i 15 minutter, og deretter fryst ved -70 °C.

4.1.6 Stimulering av CD4+ celler

CD4+ celler ble stimulert i henhold til produsentens prosedyre for CD4 aktiveringskuler.

Vask av aktiveringskuler

Kulene ble resuspendert ved vorteksmiksing i 30 sekunder. For hver brønn som skulle stimuleres ble det overført 3 µL kulesuspensjon til et 1,5 mL polypropylenrør med lav proteinbinding. Det ble i tillegg overført et overskuddsvolum på 6 µL. Det ble deretter tilsatt et likt volum av CD4-buffer 1, og suspensjonen ble vortekset i 5 sekunder. Røret ble satt på magnet i ett minutt og supernatanten kastet. Kulene ble resuspendert i CD4-medium i likt volum som uttaksvolumet, og det ble tilsatt interleukin 2 (IL-2) (1560 U/mL i 50 mmol/L fosfatbuffer m/0,1 % BSA) i forholdet 1:1.

Stimulering av CD4+ celler

Cellesuspensjon (120 000 celler i 150 µL) ble overført til brønner i et 96 brønners brett. Cellene ble så preinkubert ved 37 °C, 5 % CO₂ og høy luftfuktighet i 2 timer. Det ble deretter tilsatt 6 µL av blandingen med aktiveringskuler og IL-2 til brønner som skulle stimuleres, og 6 µL CD4-medium til brønner som ikke skulle stimuleres. Brettet ble satt på en platerister i ett minutt, før det ble satt i inkubatorskap ved 37 °C, 5 % CO₂ og høy luftfuktighet. Det ble forsøkt ulike stimuleringstider i området 0-21 timer. Etter stimulering ble cellesuspensjonene overført til 1,5 mL polypropylenrør med lav proteinbinding og fryst ved -70 °C.

4.2 Enzymassay

4.2.1 Enzymassay med GFP-4E-BP1 som substrat

Cellelysaten ble tint og homogenisert ved vorteksmiksing i 30 sekunder. Deretter ble de satt på ultralydbad i 30 sekunder, og vortekset 5 sekunder igjen like før uttak. Enzymassayet ble gjort i 1,5 mL polypropylenrør med lav proteinbinding. Rørene ble holdt på is under tilsetningen. Et volum på 10 µL cellelysat ble tilsatt 15 µL ATP og 15 µL GFP-4E-BP1, begge de sistnevnte løst i kinasebuffer I med 2 mmol/L dithiothreitol (DTT). Det ble laget sammenligningsprøver uten substrat ved å tilsette kinasebuffer I istedenfor GFP-4E-BP1. Det ble forsøkt å gjennomføre enzymassayet med flere ulike konsentrasjoner av celler (3,5-9 millioner celler/mL), ATP (0-200 µmol/L) og GFP-4E-BP1 (0-2000 nmol/L). Prøvene ble deretter inkubert i vannbad ved 37 °C. Inkuberingstidene ble variert fra 0-4 timer. Enzymreaksjonen ble stoppet ved å tilsette perklorisyre (HClO₄ 1,3 mol/L) i forholdet 1:1.

4.2.2 Enzymassay med p70 S6K

Cellelysaten ble tint og homogenisert ved vorteksmiksing i 30 sekunder. Deretter ble de satt på ultralydbad i 30 sekunder, og vortekset 5 sekunder igjen like før uttak. Enzymassayet ble gjort i 1,5 mL polypropylenrør med lav proteinbinding. Rørene ble holdt på is under tilsetningen. Reagensene ble tilsatt i følgende rekkefølge: 15 µL S6K-buffer, 5 µL S6K-substrat, 10 µL S6K-inhibitor cocktail, 10 µL cellelysat og 10 µL S6K-ATP-cocktail. Prøvene ble blandet ved 10 sekunder vorteksmiksing, før de ble inkubert i vannbad ved

30°C. Inkuberingstider fra 0 til 90 minutter ble utprøvd. For hvert tidspunkt ble det laget en identisk prøve som ikke ble inkubert, for å kunne finne hvor stor reduksjon i S6K-substratkonsentrasjon som var oppnådd.

4.3 Prøveopparbeidelse

4.3.1 Ekstraksjon av purinnukleotider

Ekstraksjon av purinnukleotider og analyse ved HPLC-UV, ble utført etter en tidligere publisert metode (64-66). Proteinfelling ble utført etter inkubering. Prøvene ble tilsatt HClO_4 (1,3 mol/L), i forholdet 1:1, vortekset i 10 sekunder og sentrifugert ved 1150 g i 2 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble overført til 1,5 mL polypropylenrør, henholdsvis 80 og 64 µL fra prøvene der totalvolumet var 100 og 80 µL. Dikalium-hydrogenfosfat (K_2HPO_4 3,0 mol/L) ble tilsatt i forholdet 1:4 for å justere til $\text{pH} \approx 6$ og felle ut ClO_4^- . Prøvene ble sentrifugert på nytt ved 1150 g i 2 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble tatt ut for analyse på HPLC-UV og plateleser. For kvantifisering på plateleser ble 10 µL av supernatanten fortynnet til 200 µL i ionebyttet vann.

4.3.2 Proteinfelling for analyse på LC-MS/MS

Den inkuberte prøveblandingen (50 µL) ble plassert på is og tilsatt 25 µL RLP1-internstandardløsning 100 µmol/L. Deretter ble 150 µL acetonitril med 0,3 % maursyre tilsatt. Røret ble vortekset 10 sekunder og sentrifugert 4 minutter ved 9400 g, 4 °C. Deretter ble 100 µL supernatant overført til vial og plassert i autosampler.

4.4 Kvantifisering

4.4.1 HPLC-metode

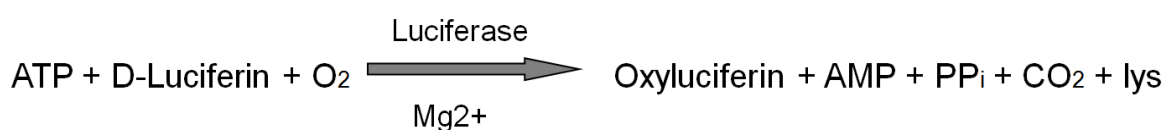
Nukleotidene ADP og ATP ble kvantifisert ved en kombinert reversfase/anionbytte HPLC-UV-metode. Kolonnene som ble benyttet var to omvendtfase-kolonner (Chromolith Performance RP-18e, 100×4.6 mm) seriekoblet foran en anionbytte-kolonne (Hypersil NH2

(APS-2) 3 μm ; 150 \times 4.6 mm). Omvendtfase-kolonnene separerer nukleotidene med hensyn på de ulike purindelene av molekylene. Anionbyttekolonnen separerer molekylene med hensyn på antall fosfatgrupper. ATP-molekylet inneholder tre fosfatgrupper og retarderes derfor sterkere på anionbyttekolonnen, og kommer senere ut i kromatogrammet i forhold til ADP, som kun har to fosfatgrupper. For å kvantifisere analyttene ble det brukt kjente eksterne standarder i området 2,5 til 150 $\mu\text{mol/L}$. Topp høydene ble brukt som mål.

Det ble brukt et lineært gradientprogram med to ulike mobilfaser. Mobilfasehastigheten var 0,75 mL/min. Mobilfase A (KH_2PO_4 5 mmol/L i ionebyttet, filtrert vann) ble gradvis redusert fra 100 % til 5 % i løpet av de første 13 minuttene, mobilfase B (KH_2PO_4 0,5 mol/L og KCl 1,0 mol/L i ionebyttet, filtrert vann) ble økt tilsvarende. Denne mobilfasesammensetningen ble holdt i 30 sekunder, før det ble skiftet tilbake til 100 % mobilfase A. Kolonnene ble rekondisjonert med mobilfase A i 11 minutter. Analyttene ble detektert med UV-absorpsjon ved 254 nm. Analytt-konsentrasjonene ble bestemt ved hjelp av en ekstern standardkurve som dekket området 2,5-150 $\mu\text{mol/L}$.

4.4.2 Luminescens

Parallelt med HPLC-UV-analysen ble ATP fra de samme prøvene også kvantifisert ved hjelp av en luciferasereaksjon. Luciferase katalyserer en ATP-avhengig reaksjon der utsendt lys står i forhold til konsentrasjonen av ATP, innenfor et visst område.



Figur 7. Luciferasereaksjon.

Kvantifisering av ATP ble utført i henhold til ATPLite prosedyrebeskrivelse. Et volum på 90 μL X-Vivo cellemedium og 50 μL cellelyseringsvæske ble overført til brønner i et 96 brønners brett. Dette ble blandet på en platerister i 5 minutter. Deretter ble det tilsatt 10 μL prøve (prøvene som er beskrevet ovenfor ble fortynnet 20 ganger i ionebyttet, filtrert vann), og så blandet på platerister i 5 minutter. Et volum på 50 μL luciferase-substratløsning, med luciferase og D-luciferin, ble tilsatt og brettet ble satt på plateristeren i 5 minutter. Brettet ble deretter satt inn i plateleseren for å stå mørkt i 10 minutter før luminescensen ble målt. ATP-

standarder fra HPLC-metoden ble fortynnet tilsvarende som prøvene, og lineær regresjon ble benyttet til konsentrasjonsberegningen.

4.4.3 LC-MS/MS-metode

Utvikling av internstandard for analyse på LC-MS/MS

Da det skulle velges en internstandard til bruk i LC-MS/MS-analysen, ble det tatt utgangspunkt i p70S6K-substratet. Dette substratet er et nonapeptid med sekvensen Lys-Lys-Arg-Asn-Arg-Thr-Leu-Thr-Lys. Det var ønskelig å finne en internstandard som oppførte seg kromatografisk tilsvarende som substratet, men som kunne detekteres ved en annen masse/ladning (m/z)-overgang. Det ble brukt en kolonne som hadde affinitet til hydrofile molekyler (hydrofil interaksjonskromatografi; HILIC). For å påvirke separasjonen i minst mulig grad, ble det derfor forsøkt å lage internstandarder ved å fjerne eller legge til en aminosyre med minst mulig hydrofile egenskaper. Det ble da syntetisert to ulike peptider med renhet > 98 % (GenScript, NJ):

- RLP1: Lys-Lys-Arg-Asn-Arg-Thr-Thr-Lys $M_w = 1031,22$
- RLP2: Lys-Lys-Arg-Asn-Arg-Thr-Leu-Leu-Thr-Lys. $M_w = 1257,54$

Begge disse ble innledningsvis testet som internstandarder. RLP1 ble detektert med m/z -overgangen $516,3 \rightarrow 452,4$ og RLP2 med overgangen $629,4 \rightarrow 565,5$.

De beste signalene for RLP1 ble funnet ved følgende betingelser: cone-spenning 40 V, kollisjonsenergi 24 eV. For RLP2 var de beste betingelsene cone-spenning 44 V, kollisjonsenergi 26 eV. De resterende betingelsene er like for de to mulige internstandardene og p70 S6K-substratet, disse er oppgitt i avsnitt 4.4.3 LC-MS/MS-metode.

Begge internstandardpeptidene viste seg å gi standardkurver med akseptabel linearitet (henholdsvis $R^2 = 0,9996$ og $0,9997$ for RLP1 og RLP2), men RLP1 ble valgt som internstandard fordi den overlappet i størst grad med substratets elueringsvindue.

LC-MS/MS-kvantifisering

Peptidet som ble brukt som substrat for p70 S6K, ble kvantifisert ved hjelp av en analysemetode basert på væskechromatografi koplet til tandem massespektrometri (LC-

MS/MS). Instrumentet bestod av en kromatografimodul (Waters 2795 Separations Module) og en MS/MS med elektropray (Waters Quattro micro API). Dataprogrammet Waters MassLynx ble brukt til å styre alle prosessene.

Isokratisk hydrofil interaksjonskromatografi (HILIC) ble anvendt for å separere substrat og internstandard fra injeksjonsfronten. Kolonnen som ble benyttet var en Atlantis HILIC 3 μm , 2,1 \times 50 mm, med forkolonnen Atlantis HILIC 3 μm , 2,1 \times 10 mm. Mobilfasen bestod av 62,5 % acetonitril tilsatt 0,3 % maursyre og ble pumpet med hastighet 0,400 mL/min. Injeksjonsvolum var 10 μL . Injeksjonsnålen ble vasket med vann:acetonitril 1:2 tilsatt 1,0 % maursyre mellom hver injeksjon.

Elektropray ble brukt som fordampings-/ioniseringsteknikk. Kapillærspenningen ble satt til 1,20 kV og cone-spenningen var 40 V for både substrat og internstandard.

Ionekildetemperaturen var 120 °C og gassfasetemperaturen var 450 °C. Nitrogen ble brukt som nebulisatorgass og cone-gass med hastighet på henholdsvis 650 L per time og 40 L per time. Masse/ladning-overgangene til dobbeltprotonert substrat (572,9 \rightarrow 509,0) og internstandard RLP1 (516,3 \rightarrow 452,4) ble monitorert med dwell-tid satt til 0,500 sekunder. Ionene ble fragmentert ved hjelp av argongass justert til $3,5 \times 10^{-3}$ mBar, og kollisjonsenergien ble satt til henholdsvis 25 eV og 24 eV for substrat og RLP1.

Prøvene ble injisert med 10 minutters mellomrom og mobilfasen ble ført inn i massespektrometeret mellom 2 og 9,5 minutter.

Toppene ble integrert og ratio mellom substratets og internstandardens toppareal ble brukt som respons. Konsentrasjonsberegning ble basert på gjennomsnittet av tre kalibratorer med substrattilsetning 50,0 $\mu\text{mol/L}$.

4.4.4 Databehandling/avlesing av resultater

Purinnukleotid-analyser

Resultatene ble beregnet på tre ulike måter.

- Ved å finne differansen mellom ATP-konsentrasjon i prøveløsningene etter gjennomføring av enzymassayet.

$$\Delta[ATP] = [ATP]_{u/substrat} - [ATP]_{m/substrat}$$

- Ved å finne differansen mellom ADP-konsentrasjon i prøveløsningene etter gjennomføring av enzymassayet.

$$\Delta[ADP] = [ADP]_{m/substrat} - [ADP]_{u/substrat}$$

- Ved å finne differansen mellom ADP/ATP-ratio i prøveløsningene etter gjennomføring av enzymassayet.

$$\Delta\left(\frac{[ADP]}{[ATP]}\right) = \left(\frac{[ADP]}{[ATP]}\right)_{m/substrat} - \left(\frac{[ADP]}{[ATP]}\right)_{u/substrat}$$

For alle beregningsmetodene var det ønskelig at differansene skulle bli så store som mulig for å påvise høy mTOR-aktivitet.

4.5 Ethiske aspekter

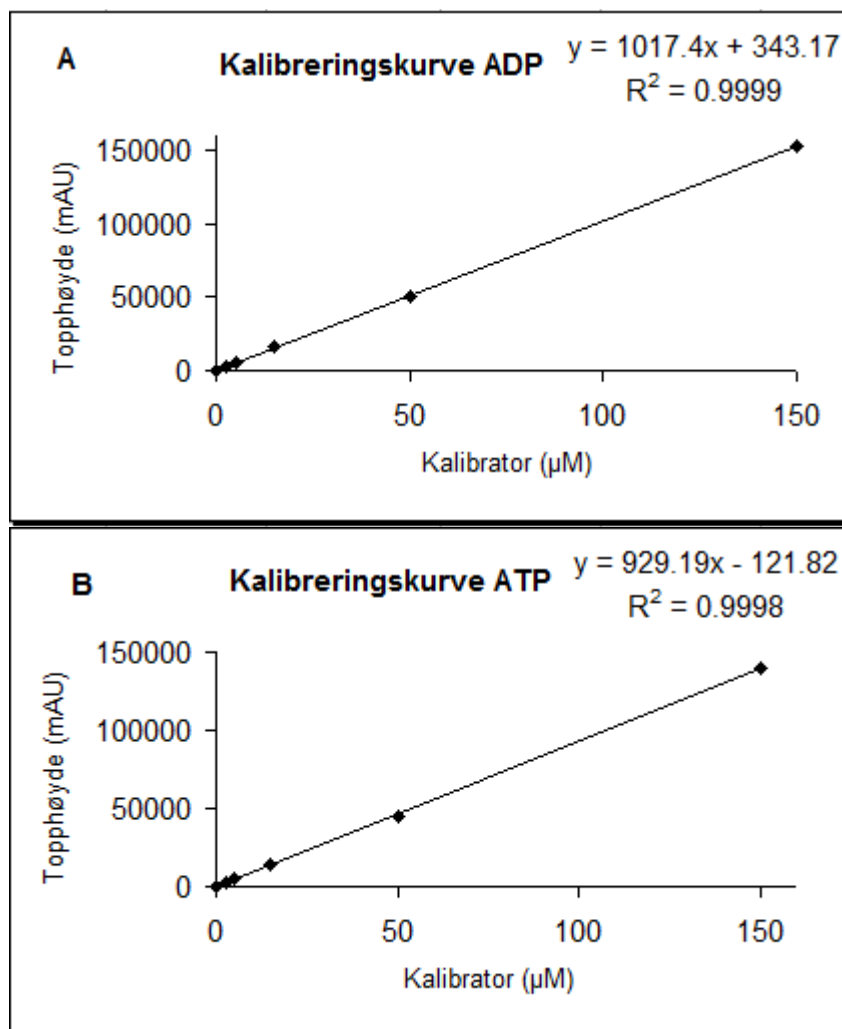
I de tilfeller hvor prøvemateriale fra pasienter ble benyttet til metodeutviklingen, ble det utelukkende brukt overskuddsmateriale fra allerede innsamlede rutineprøver. Det innebar at ingen ekstra prøvetaking ble gjennomført. Prøvene ble anonymisterte ved at ingen pasientopplysninger utover bruk/ikke bruk av mTOR-hemmer eller takrolimus ble registrert. Anvendelsen av det biologiske materialet var i tråd med godkjent bruk av "Diagnostikk- og behandlingsbiobank nr. 329" ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus. Prøver fra friske personer ble tatt etter informert samtykke.

5 Resultater

5.1 Testing av kvantifiseringsmetoder

HPLC-UV

Metoden for kvantifisering av purinnukleotider var tidligere validert i laboratoriet ved 2,50 og 15,0 μM . Intra- og interserie variasjonskoeffisienter (VK) var henholdsvis $\leq 2,5 \%$ ($n = 6$) og $\leq 5,4 \%$ ($n = 6$) for ADP, og $\leq 3,5 \%$ ($n = 6$) og $\leq 12,6 \%$ ($n = 6$) for ATP.

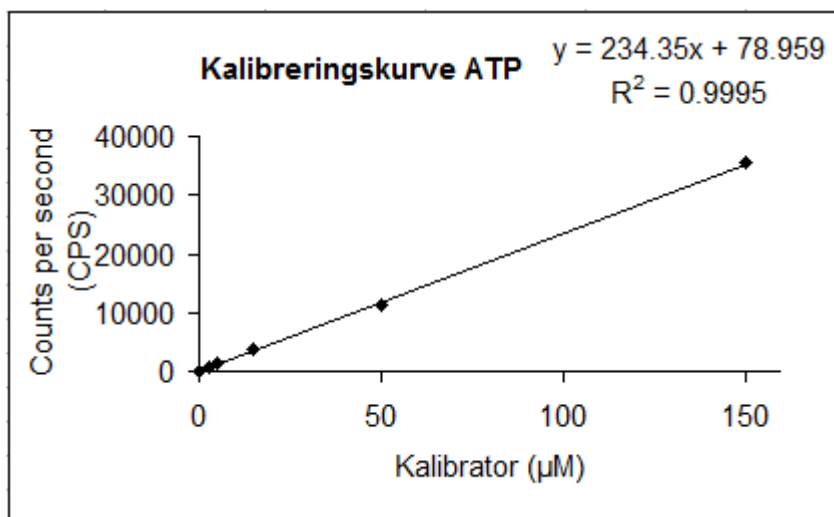


Figur 8. Kalibreringskurver for purinnukleotider kvantifisert ved HPLC-UV. 8A: ADP-kalibreringskurve. 8B: ATP-kalibreringskurve.

For å undersøke om det var linearitet i måleområdet, ble det laget kalibreringskurver med kalibratorer i området 2,5-150 μM . Figur 8 viser eksempler på kalibreringskurver for ADP og ATP. Metoden ble vurdert til å ha akseptabel linearitet i måleområdet for begge analytter, $R^2 \approx 1$. Disse kalibreringskurvene er representative for alle forsøkene der HPLC-UV ble brukt som kvantifiseringsmetode.

Luminescens

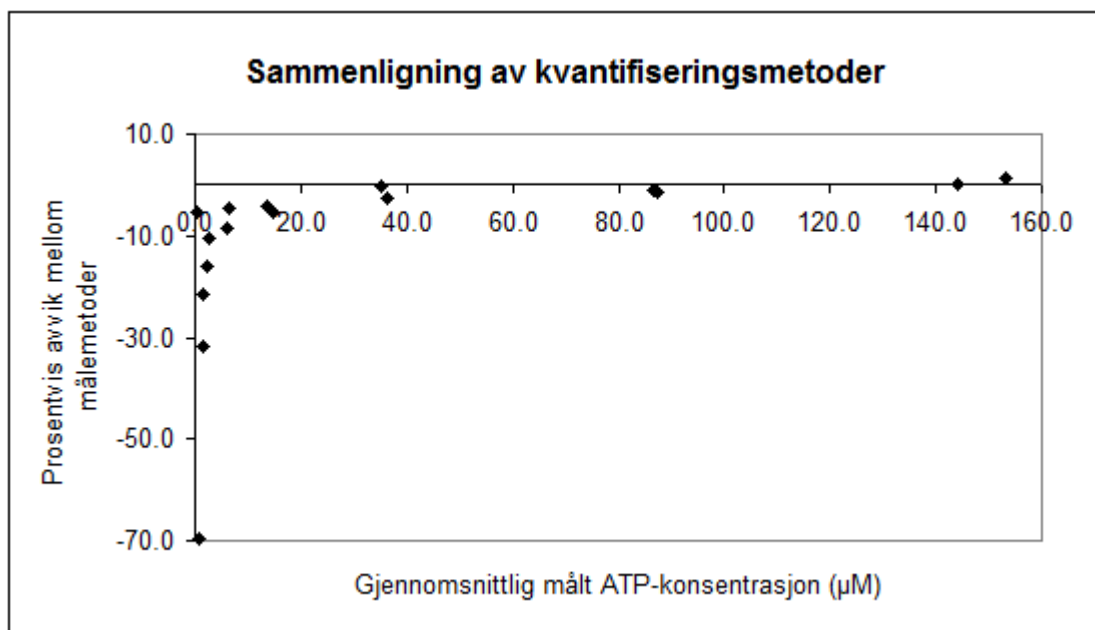
Kalibreringskurver ble laget med kalibratorer i området 2,5-150 μM . Figur 9 viser et eksempel på en kalibreringskurve for ATP. Denne er representativ for alle forsøkene der luminescens ble brukt som kvantifiseringsmetode. Også luminescensmålingene utviste stor grad av linearitet i måleområdet, $R^2 \approx 1$.



Figur 9. Kalibreringskurve for ATP kvantifisert ved luminescens.

5.1.1 Sammenligning av HPLC-UV og luminescenskvantifisering

For å vurdere overensstemmelse mellom kvantifiseringsmetodene, ble ATP-konsentrasjonen bestemt både ved HPLC-UV og luminescensmålinger ved flere forsøk. Figur 10 presenterer data fra ett slikt forsøk.



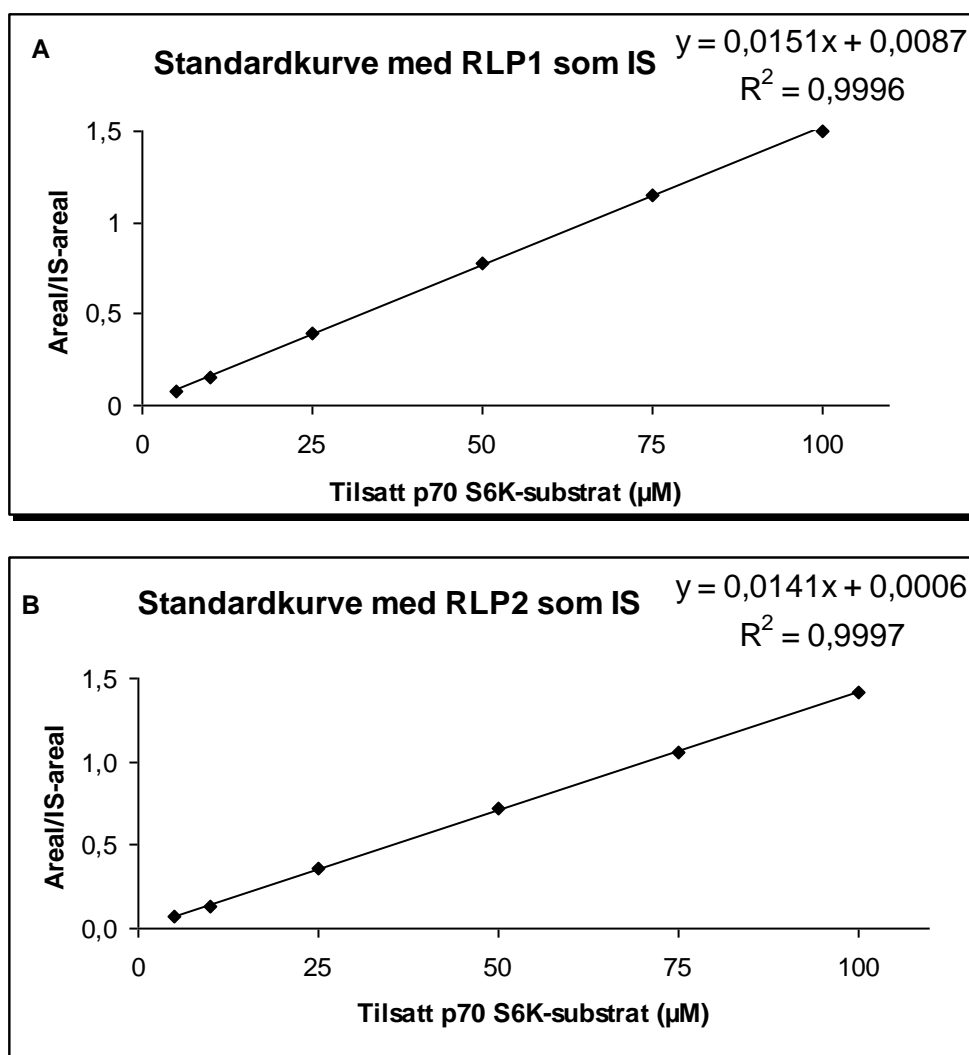
Figur 10. Sammenligning av HPLC-UV- og luminescenskvantifisering. Prosentvis avvik i luminescensbestemt konsentrasjon fra ATP-konsentrasjon bestemt ved HPLC-UV, mot gjennomsnittlig konsentrasjon fra de to målemetodene.

Målingene fra de to kvantifiseringsmetodene samsvarte godt ved konsentrasjoner $\geq 6 \mu\text{M}$ (Se figur 9). I måleområdet $>35 \mu\text{M}$ var forskjellene mindre enn 3 %. Imidlertid utgjør disse små forskjellene mye når man ser på den prosentvise forskjellen i ΔATP . Fordi forskjellene mellom prøvene med og uten substrat er så små, blir ΔATP svært følsomt for små variasjoner. Disse funnene stemte godt overens med observasjoner gjort i flere av våre forsøk.

5.1.2 Utprøving av LC-MS/MS-analyse av p70 S6K-substrat

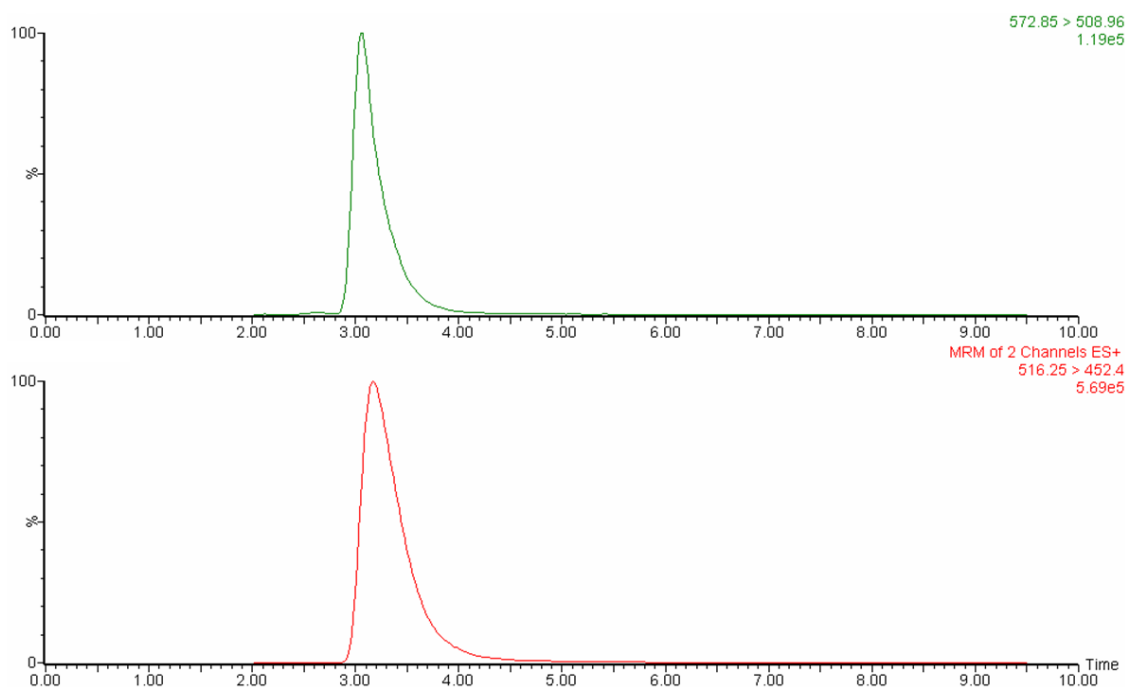
Vurdering av linearitet

Som en del av metodeutviklingen for LC-MS/MS-kvantifisering av p70 S6K-substratet ble linearitet i måleområdet $5\text{--}100 \mu\text{M}$ undersøkt. Internstandardene (IS) ble tilsatt i konsentrasjon $50 \mu\text{M}$, som var den samme som p70 S6K-substratet var før inkubering av enzymassayet. Substratet ble fortynnet i vann og prosedyren for prøveopparbeidelse for LC-MS/MS ble fulgt.



Figur 11. Undersøkelse av linearitet. Standardkurver med RLP1 (11A) og RLP2 (11B) som internstandard. Forholdet mellom areal av substrattopp og IS-topp plottet mot tilsatt p70 S6K-substrat.

Standardkurvene ble vurdert å være lineære i hele måleområdet både da RLP1 og RLP2 ble benyttet som internstandard. RLP1 ble valgt som internstandard, da denne overlappet i størst grad med p70 S6Ks elueringsvindu.



Figur 12. Kromatogram fra LC-MS/MS. p70 S6K- substrat øverst og RLP1 nederst.

Vurdering av presisjon

Preliminær validering ble utført ved konsentrasjonene 1,00 - 2,50 - 10,0 - 25,0 - 50,0 $\mu\text{mol/L}$. Ved hvert nivå ble det analysert en kontroll tidlig og en kontroll sent i hver av 4 serier ($n = 8$). De beregnede variasjonskoeffisientene var $\leq 4,5 \%$ og gjennomsnittlig nøyaktighet var 95,0 - 101 %.

5.2 Utpøving av 4E-BP1 enzymassay

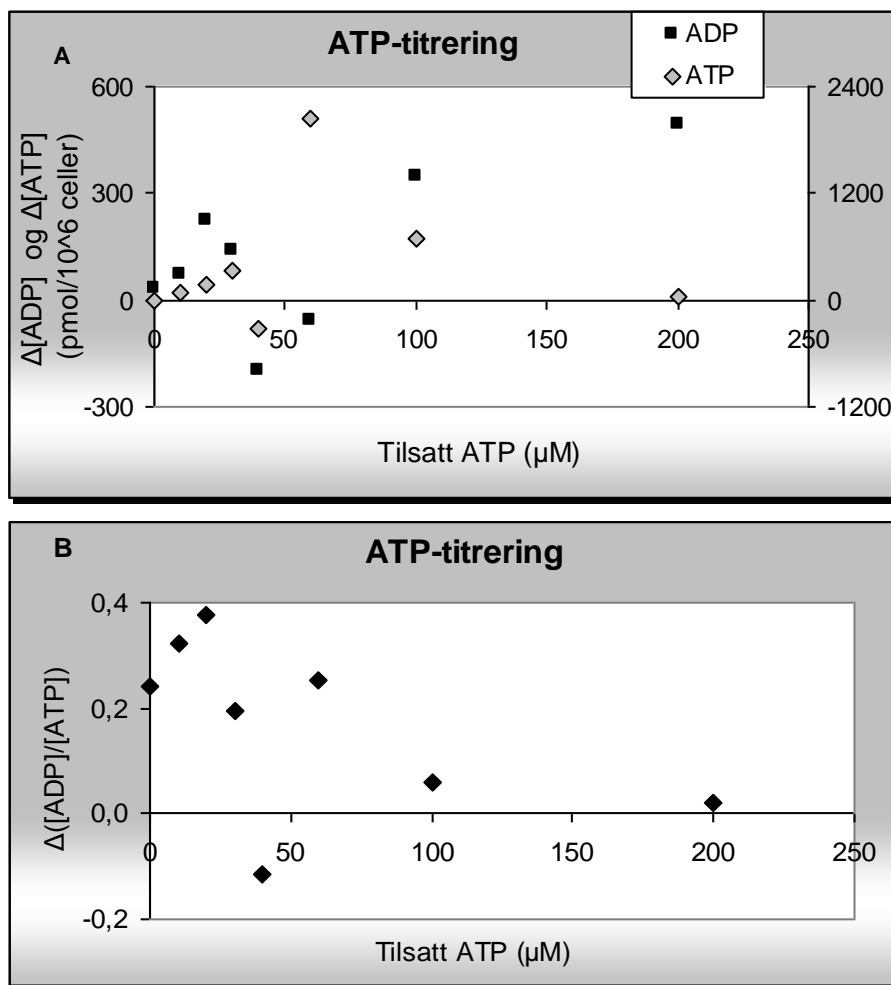
5.2.1 Ustimulerte PBMC

Det ble først forsøkt å bruke ustimulerte PBMC i enzymassayet da dette vil være en enkel og rask metode for cellebehandling.

Utpøving av ulike ATP-konsentrasjoner

Innledningsvis ble det utprøvd ulike ATP-konsentrasjoner i enzymassayet. Dette ble gjort for å undersøke om det var noen sammenheng mellom økende ATP-konsentrasjon og enzymaktivitet. Det var også et mål å finne den ATP-konsentrasjonen der enzymaktiviteten

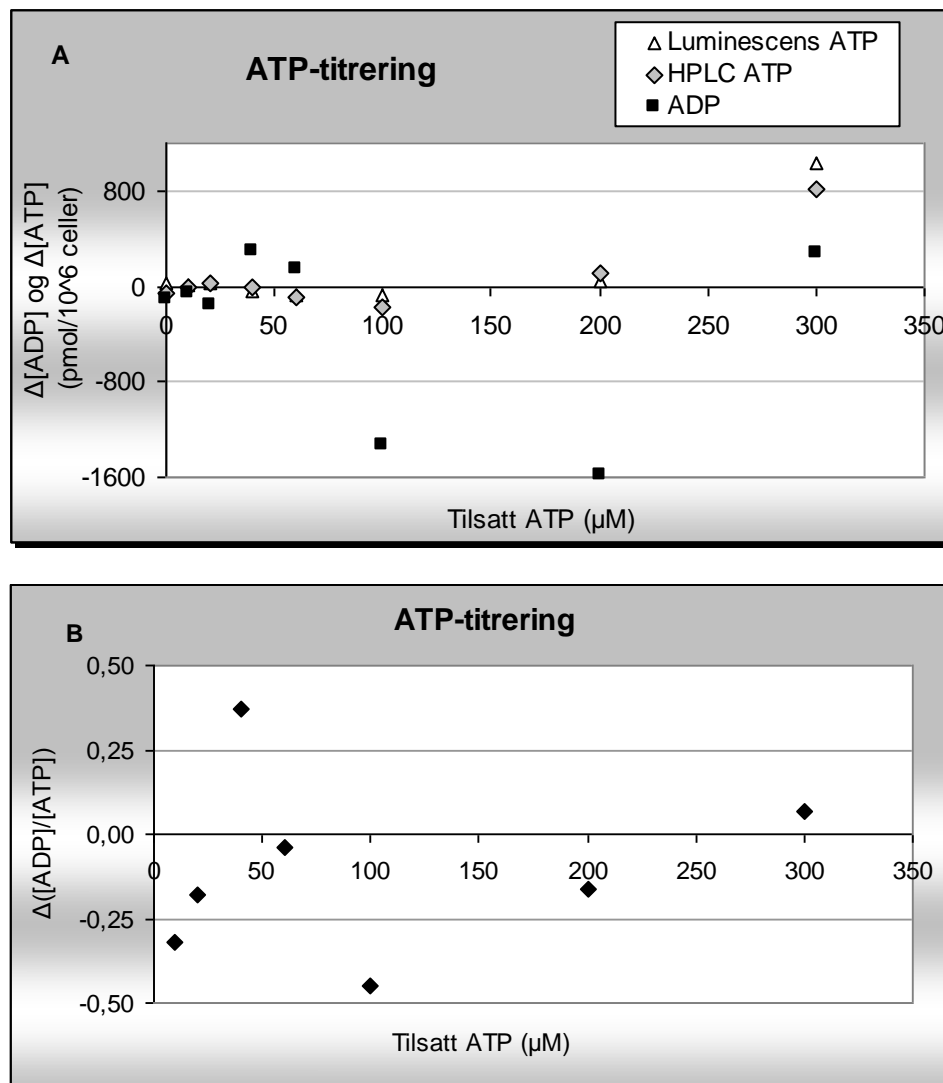
var høyest, V_{max} , for å kunne optimalisere enzymassayet. ATP-konsentrasjonen ble variert mellom 0 og 200 μM . De andre betingelsene ble holdt konstante.



Figur 13. Titrering av ATP-konsentrasjon for 4E-BP1 enzymassay. GFP-4E-BP1 400 nM, cellekonsentrasjon 1 682 000 celler/mL, inkubert ved 37 °C i 60 minutter. ATP og ADP ble kvantifisert ved HPLC-UV. 13A: $\Delta[\text{ADP}]$ (første Y-akse) og $\Delta[\text{ATP}]$ (andre Y-akse) plottet mot tilsatt ATP-konsentrasjon. Figur 13B. $\Delta([\text{ADP}]/[\text{ATP}])$ plottet mot tilsatt ATP-konsentrasjon.

De første forsøkene som ble gjort, indikerte at ΔADP var et mål som kunne fungere i kvantifiseringen av mTOR-aktivitet. De fleste punktene lå omtrent på en kurve som kunne passe inn i en Michaelis-Menten kinetisk modell. At noen punkter ikke passet inn i denne modellen kunne det være flere årsaker til. Det ble antatt at dette kunne være unøyaktigheter som pipetteringsfeil eller unøyaktige cellekonsentrasjoner. For ΔATP og $\Delta([\text{ADP}]/[\text{ATP}])$ var det imidlertid ingen slik tendens.

Det ble gjort flere forsøk for å undersøke om Δ ADP-målinger kunne egne seg til kvantifisering. Da ble det også tilsatt ATP i høyere konsentrasjoner, fordi det kunne se ut som at V_{max} ikke var nådd ved 200 μ M ATP. ATP-konsentrasjonene ble nå også bestemt ved hjelp av luminescensmålinger for å undersøke om de to kvantifiseringsmetodene ga samsvarende resultater (for mer om dette se 5.1.1 Sammenligning av HPLC-UV og luminescenskvantifisering).

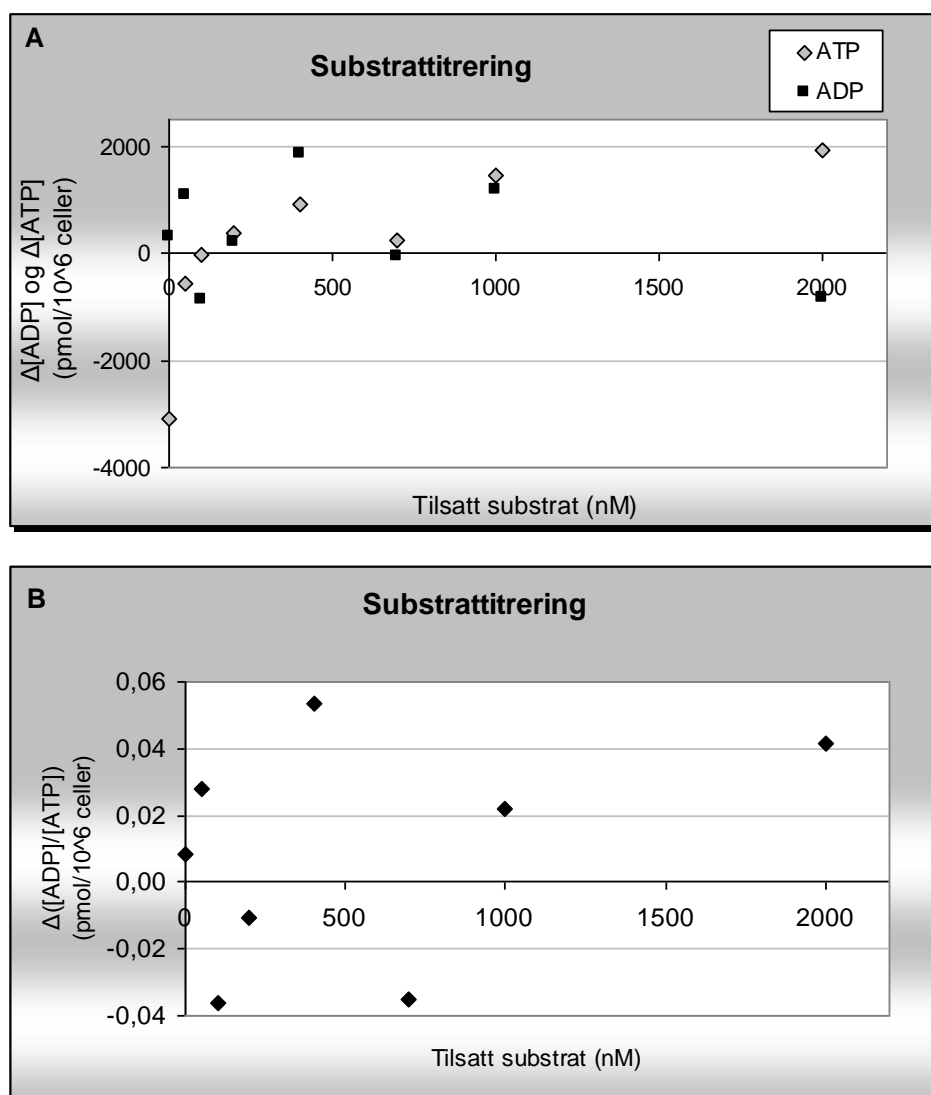


Figur 14. Titrering av ATP-konsentrasjon for 4E-BP1 enzymassay, forsøk 2. GFP-4E-BP1 400 nM, cellekonsentrasjon 2 462 000 celler/mL, inkubering ved 37 °C i 60 minutter. 14A: $\Delta[ADP]$ og $\Delta[ATP]$ plottet mot ATP-konsentrasjon tilsatt i enzymassayet. ATP-konsentrasjoner ble målt både ved HPLC-UV og luminescens. 14B: $\Delta([ADP]/[ATP])$ plottet mot ATP-konsentrasjon tilsatt i enzymassayet, målt ved HPLC-UV. Punktet X = 0 er ekskludert på grunn av problemer med kromatografien.

Verken $\Delta[\text{ADP}]$, $\Delta[\text{ATP}]$ eller ratioene samsvarte med observasjonene som ble gjort i de første forsøkene. Det ble heller ikke observert noe tydelig system i målingene.

Utpøving av ulike substrat (GFP-4E-BP1)-konsentrasjoner

Videre ble det prøvd ut ulike substratkonsentrasjoner i enzymassayet i området 0-2000 nM. De andre betingelsene ble holdt konstante. Det var ønskelig å finne en positiv sammenheng mellom tilsatt mengde substrat og enzymaktivitet. I tillegg til HPLC-UV- kvantifisering av analyttene, ble ATP-konsentrasjon også bestemt ved luminescensmålinger (data ikke vist).

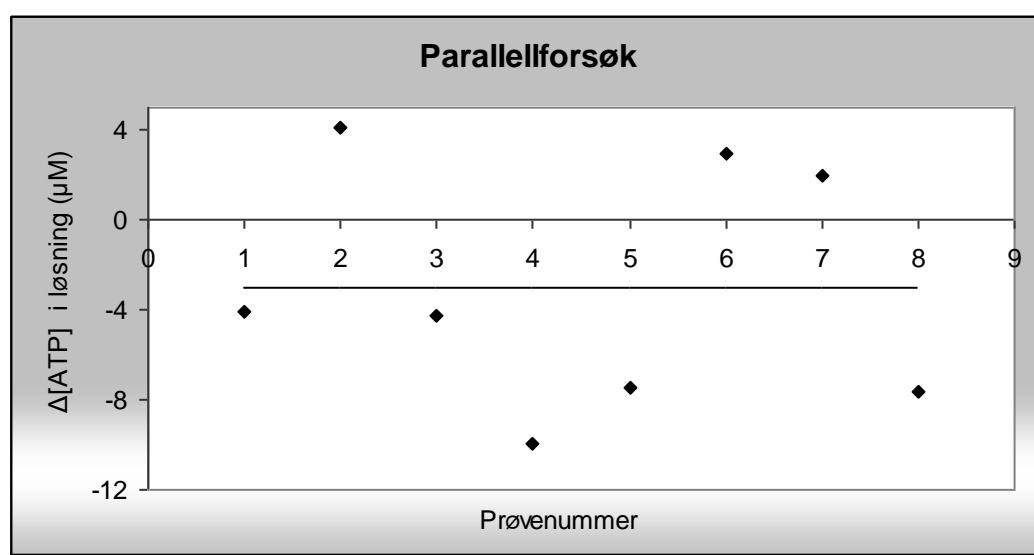


Figur 15. Titrering av substratkonsentrasjon for 4E-BP1 enzymassay. Tilsatt ATP konsentrasjon 200 μM , cellekonsentrasjon 1 000 000 celler/mL, inkubering i 37 °C i 60 minutter, kvantifisert ved HPLC-UV. 15A: $\Delta[\text{ADP}]$ og $\Delta[\text{ATP}]$ mot GFP-4E-BP1-konsentrasjoner. 15B: $\Delta([\text{ADP}]/[\text{ATP}])$ mot GFP-4E-BP1-konsentrasjoner.

De første resultatene fra substrat-titreringsforsøkene viste ingen klar tendens med tanke på $\Delta[\text{ADP}]$. Det kunne derimot se ut som om $\Delta[\text{ATP}]$ økte med økende GFP-4E-BP1-konsentrasjon på en måte som kunne passe inn i en Michaelis-Menten-kinetisk modell. Imidlertid var målingene negative for substratverdier lik eller mindre enn 100 nM. Det ble også observert at målingen ved 700 nM var lavere enn man skulle anta for at enzymreaksjonen skulle følge Michaelis-Menten-kinetikk. Det ble heller ikke observert noen sammenheng da resultatene ble avlest som $\Delta([\text{ADP}]/[\text{ATP}])$. Forsøket ble gjentatt, men resultatene viste svært liten grad av overensstemmelse med resultatene fra det første substrat-titreringsforsøket (data ikke vist).

Andre forsøk

Det ble også undersøkt om andre inkuberingstider eller ulike cellekonsentrasjoner kunne egne seg bedre i enzymassayet. Inkuberingstider mellom null og fire timer, og cellekonsentrasjoner fra 1,0 til 2,5 millioner celler/mL ble utprøvd. Dette ga ikke tydeligere resultater (data ikke vist).



Figur 16. $\Delta[\text{ATP}]$ plottet mot prøvenummer av åtte paralleller av 4E-BP1 enzymassay.

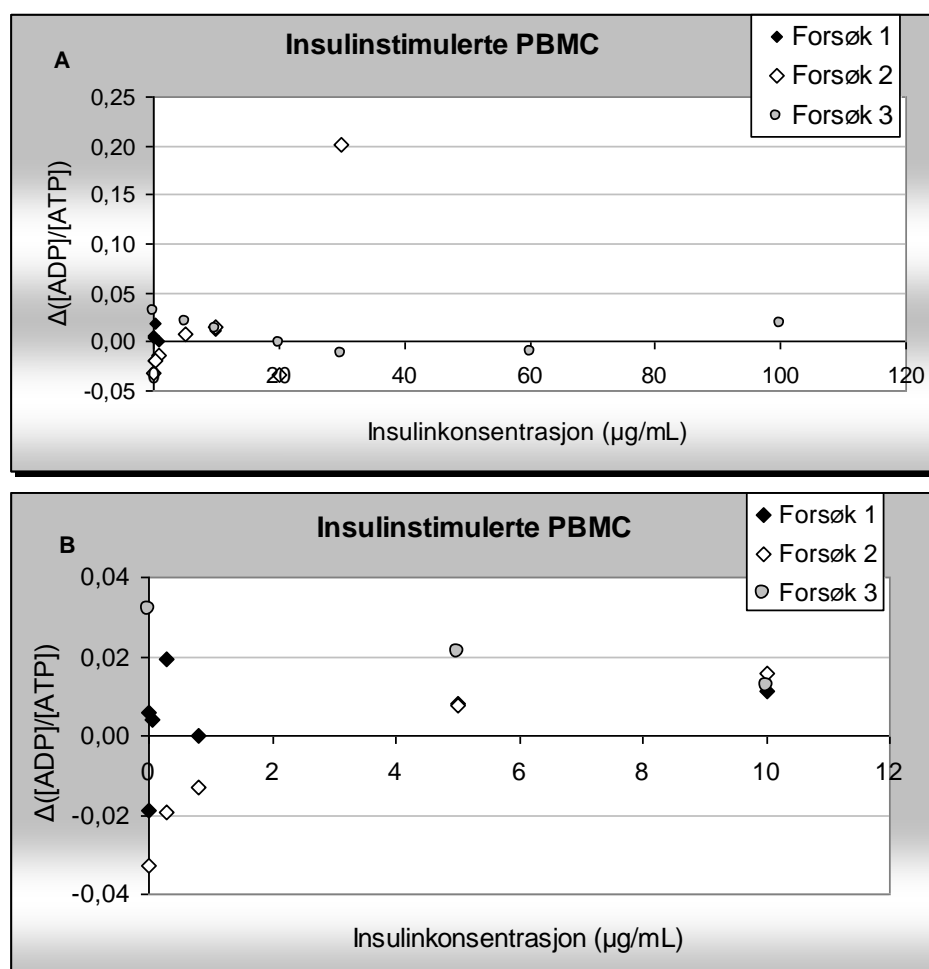
Linjen viser gjennomsnittet av alle målingene. Cellekonsentrasjon 750 000 celler/mL, ATP 100 μM , GFP-4E-BP1 400 nM, inkubert ved 37 °C i 60 minutter.

For å undersøke om det var mulig å påvise at resultatene var gjennomsnittlig større enn null, ble det til slutt gjennomført et forsøk der det ble laget åtte like paralleller av et enzymassay-opplett. Resultatene ble kun avlest ved hjelp av luminescensmålinger, og er derfor kun

presentert ved $\Delta[\text{ATP}]$, se figur 16. Det kunne ikke påvises at $\Delta[\text{ATP}]$ var større enn null. I dette forsøket ble det observert negative verdier i fem av åtte målinger. Gjennomsnittet av målingene var også negativt ($-3,04 \mu\text{M}$).

Videre vil det kun bli vist resultater som $\Delta([\text{ADP}]/[\text{ATP}])$, da dette anses som en god fremstilling og de andre avlesningsmetodene ikke viste seg som bedre egnet.

5.2.2 PBMC stimulert med insulin



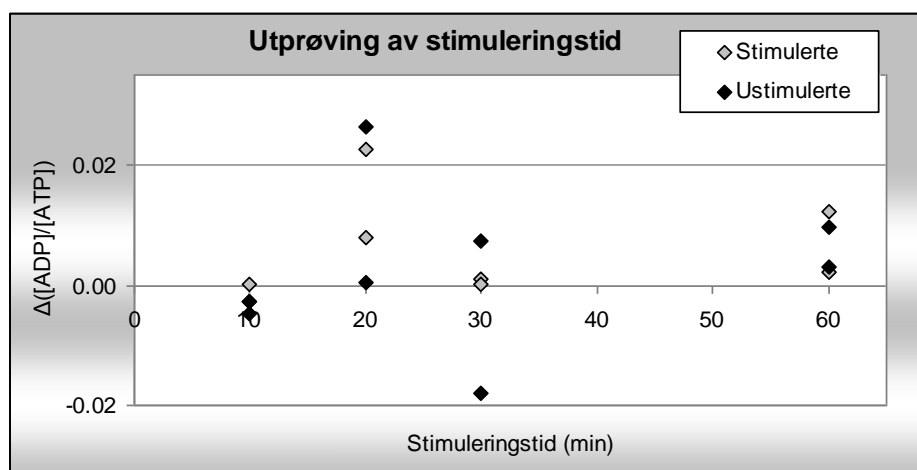
Figur 17. Titrering av insulinkonsentrasjoner, 4E-BP1 enzymassay. PBMC ble suspendert i RPMI 1640, insulin fortynnet med X-Vivo. Stimuleringstid 15 minutter, cellekonsentrasjon 150 000 celler/mL. Enzymassayet ble utført med ATP 100 μM , GFP-4E-BP1 400 nM og inkubert ved 37 °C i 60 minutter. 17A: Resultater for alle utprøvde insulinkonsentrasjoner. 17B: Resultater for insulinkonsentrasjoner $\leq 10 \mu\text{g/mL}$.

Da det ikke var mulig å påvise at $\Delta[\text{ATP}]$ var signifikant større enn null, ble det videre forsøkt å stimulere PBMC med insulin for å øke aktiviteten av mTOR. Det ble utført tre forsøk med ulike insulinkonsentrasjoner i området 0-100 $\mu\text{g/mL}$.

Forsøk med mononukleære celler stimulert med insulin, ga sprikende resultater. Da det ble gjort tre tilnærmet like forsøk med insulinstimulering, samsvarte data fra de ulike forsøkene dårlig med hverandre (se figur 17). Resultater fra det første forsøket kunne indikere at det var en økende tendens i mTOR-aktivitet med økende insulinkonsentrasjon, men dette var ikke reproducerbart. Det ble også forsøkt å bruke flere ulike cellemedier (RPMI 1640 med 10 % kalveserum, kun RPMI 1640) under stimuleringen uten at dette ga bedre resultater (data ikke vist).

5.2.3 CD4+ celler stimulert via CD3-, CD28- og IL-2-reseptor

Da forsøk med PBMC ikke ga ønskede resultater, ble det videre forsøkt å isolere CD4+ celler og stimulere disse via simultan aktivering av CD3-, CD28- og IL-2-reseptor. Det ble utprøvd ulike stimuleringstider og gjort to parallelle forsøk for hvert tidspunkt. For å undersøke om stimuleringen hadde noen innvirkning på enzymaktiviteten, ble det gjennomført enzymassays både med stimulerte og ustimulerte celler. I de første forsøkene ble det benyttet blod fra en immunsupprimert pasient som ikke brukte noen mTOR-hemmer.

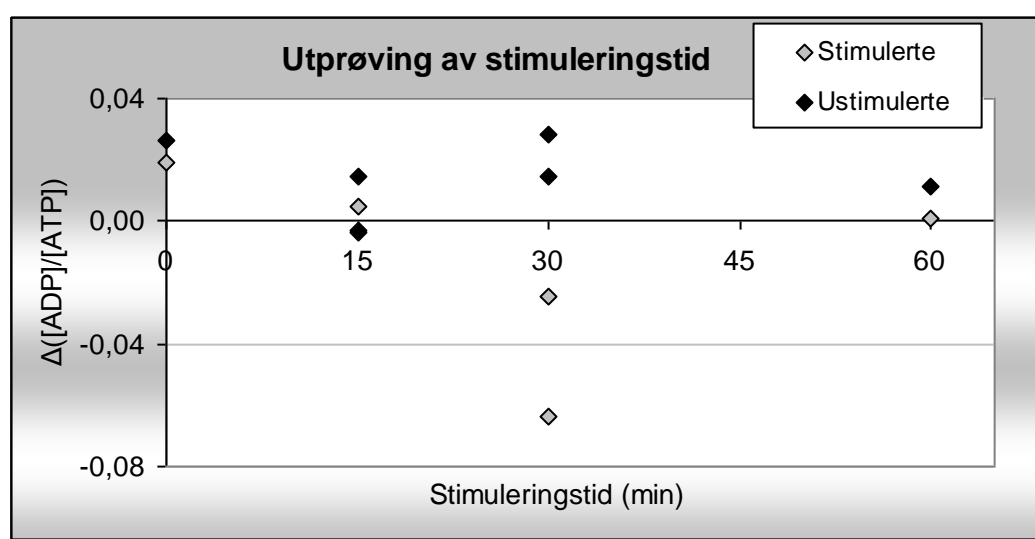


Figur 18. Utprøving av stimuleringstider (via CD3, CD28 og IL-2), 4E-BP1 enzymassay. CD4+ celler fra en transplantert pasient som ikke brukte mTOR-hemmer.

Cellekonsentrasjon i enzymassay 200 000 celler/mL. GFP-4E-BP1 400 nM, ATP 100 μM , inkubert ved 37 °C i 60 minutter.

Heller ikke for CD4⁺ celler ble det funnet noen tydelig sammenheng mellom aktivering og $\Delta([ADP]/[ATP])$. Det var ut i fra disse resultatene ikke mulig å skille de stimulerede cellene fra de ustimulerede med hensyn på $\Delta([ADP]/[ATP])$.

Forsøket ble gjentatt, men denne gangen ble det tappet blod fra en frisk frivillig person og stimuleringsstidene var litt endret. Det ble også tilsatt fosfatase- og proteasehemmere like før de stimulerede cellene ble fryst, for å se om dette kunne bidra til stabilisering av aktivert mTOR og dermed øke aktiviteten i assayet. Det ble utført to parallelle målinger ved tidene 15 og 30 minutter, og enkeltmålinger ved 0 og 60 minutter.



Figur 19. Utprøving av stimuleringsstider (via CD3, CD28 og IL-2), 4E-BP1 enzymassay. CD4⁺ celler fra en frisk person. Cellekonsentrasjon i enzymassay 200 000 celler/mL, GFP-4E-BP1 400 nM, ATP 100 μ M, inkubert ved 37 °C i 60 minutter.

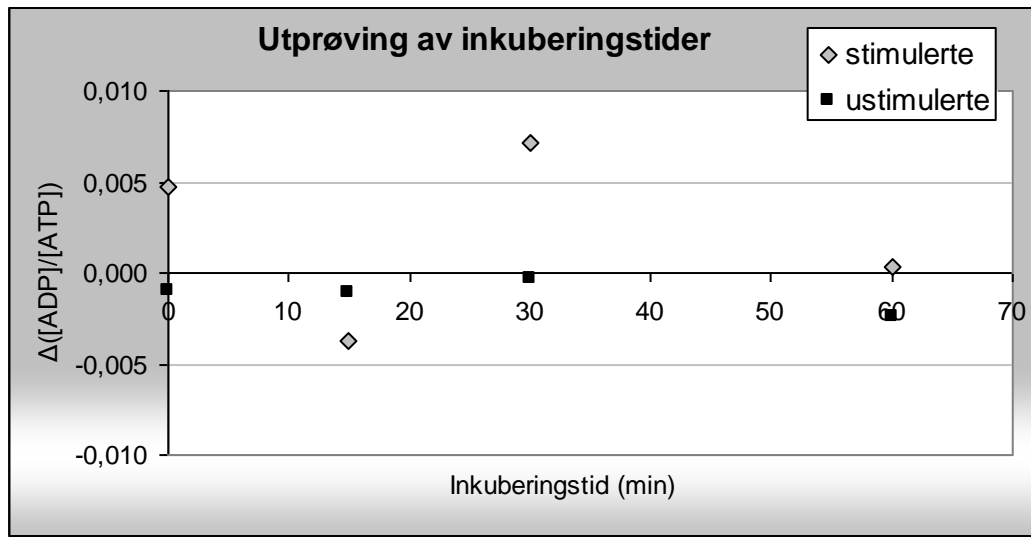
Heller ikke i dette forsøket kunne det påvises noen sammenheng mellom stimulering og mTOR-aktivitet. Forsøket viste heller ingen tydelig overensstemmelse med det første forsøket som ble gjort med stimulerede CD4⁺ celler.

Forsøkene der GFP-4E-BP1 var brukt som substrat, hvor ATP og ADP ble brukt til å kvantifisere fosforyleringshastighet viste svært sprikende resultater. Det ble ikke påvist mTOR-aktivitet ved dette oppsettet, og det ble derfor valgt å gå videre med et annet enzymassay.

5.3 Utprøving av p70 S6K enzymassay

5.3.1 CD4+ celler stimulert via CD3-, CD28- og IL-2-reseptor

Det ble først forsøkt å måle fosforyleringshastigheten av p70 S6K-substratet i stimulerede CD4+ celler, ved å kvantifisere ATP og ADP ved hjelp av HPLC-UV.



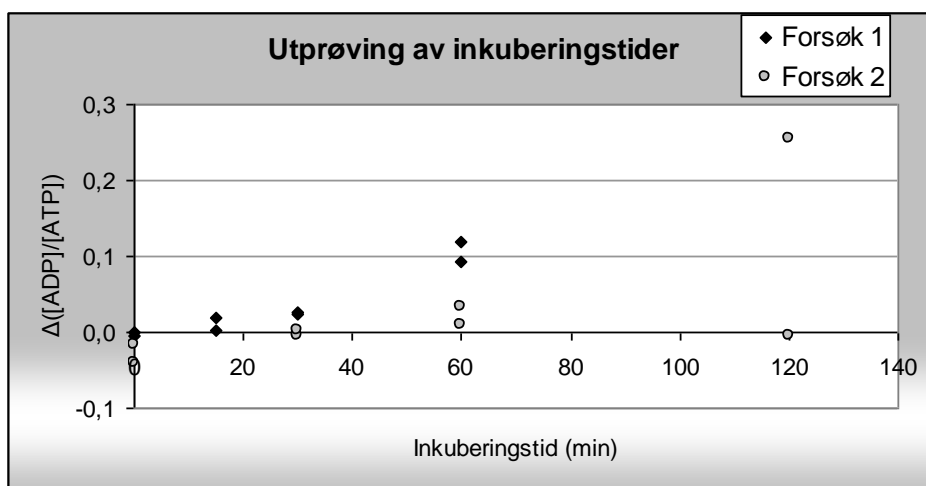
Figur 20. Utprøving av inkuberingstid, p70 S6K enzymassay. CD4+ celler stimulert via CD3-, CD28- og IL-2-reseptor. Stimuleringstid 15 minutter, cellekonsentrasjon 160 000 celler/mL.

Det var ikke mulig å påvise noen aktivitet av p70 S6K ved dette oppsettet. I likhet med tilsvarende forsøk gjort med GFP-4E-BP1 kunne det virke som om $\Delta([ADP]/[ATP])$ var relativt tilfeldig fordelt.

5.3.2 Ustimulerte PBMC

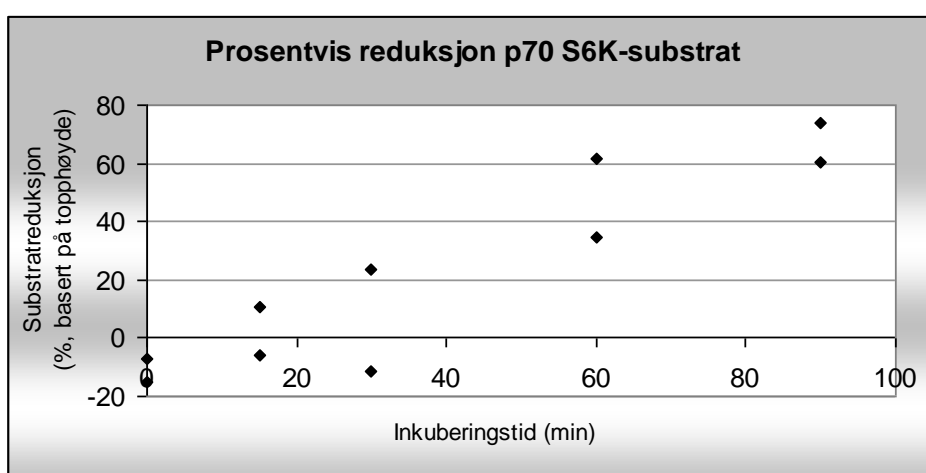
Utprøving av ulike inkuberingstider

Det ble forsøkt å gjøre p70 S6K enzymassayet direkte i lysat av ustimulerte PBMC, isolert fra en frisk person. Det ble gjort to forsøk der inkuberingstider i området 0-120 minutter ble utprøvd. For hver tid ble det gjort to parallelle forsøk.



Figur 21. Utprøving av inkuberingstid, p70 S6K enzymassay. Ustimulerte PBMC. Forsøk 1: cellekonsentrasjon 1,9 millioner celler/mL, forsøk 2: cellekonsentrasjon 3,0 millioner celler/mL.

Det første forsøket (figur 21) viste en tydelig positiv sammenheng mellom økende inkuberingstid og $\Delta([ADP]/[ATP])$. Dessuten var $\Delta([ADP]/[ATP])$ positive for alle de inkuberte prøvene. Det andre forsøket viste ikke like tydelig økning. Det var kun for prøvene som var inkubert i 60 minutter at begge parallellene var positive. Allikevel kan det se ut som om det er en positiv sammenheng mellom inkuberingstid og $\Delta([ADP]/[ATP])$. Videre ble det forsøkt å gjøre det samme forsøket ved å bestemme reduksjon i p70 S6K-substratet ved hjelp av LC-MS/MS.

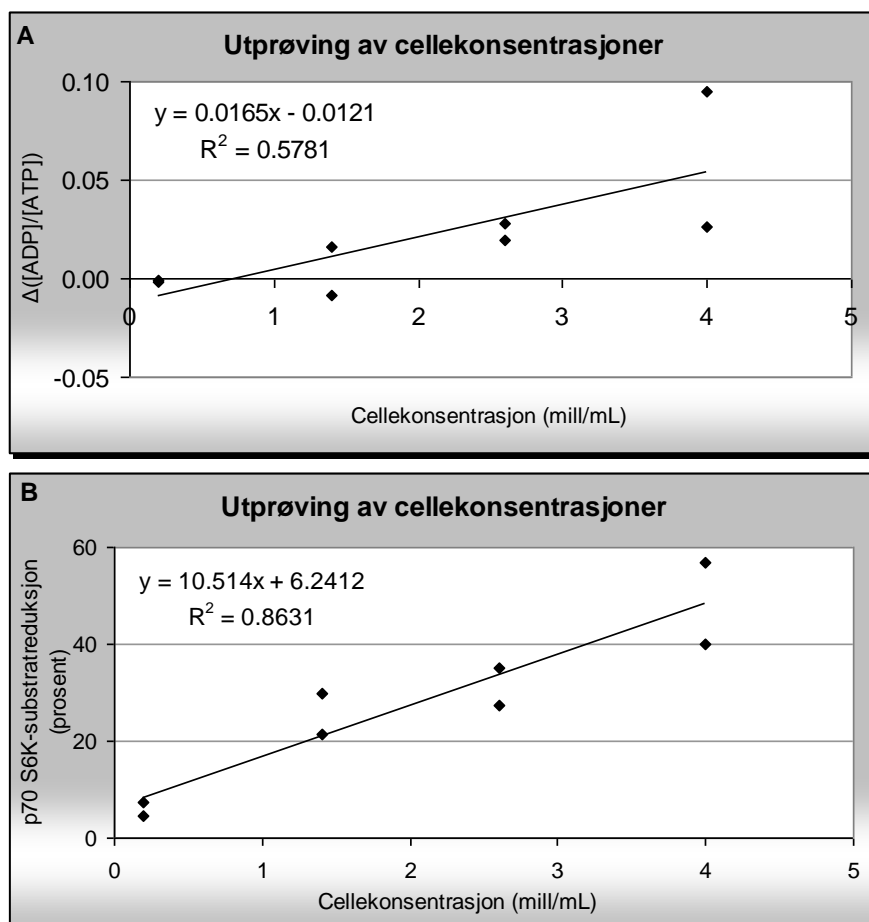


Figur 22. Utprøving av inkuberingstid, p70 S6K enzymassay. Prosentvis reduksjon av p70 S6K-substrat mot inkuberingstid. Cellekonsentrasjon 1 900 000 celler/mL, p70 S6K-substrat 714 μ M. LC-MS/MS-analyse utført uten internstandard.

Resultatene fra substratmålingene viste en tydelig positiv sammenheng mellom inkuberingstid og substratreduksjon. For de to prøvene som var inkubert i 90 minutter viste den ene en reduksjon på 61 prosent og den andre 74 prosent. Disse forsøkene var gjort uten internstandard, da denne ikke var mottatt da forsøket ble utført. I de videre forsøkene ble 45 minutter valgt som inkuberingstid.

Utpøving av ulike cellekonsentrasjoner

Det ble forsøkt å utføre enzymassayet med PBMC i ulike cellekonsentrasjoner i området 0,2-4,0 millioner celler/mL. De andre betingelsene ble holdt konstante. Prøvene ble analysert både på HPLC-UV for å finne $\Delta([ADP]/[ATP])$ og på LC-MS/MS for å finne reduksjon i p70 S6K-substratet.



Figur 23. Utpøving av cellekonsentrasjoner, p70 S6K enzymassay. Inkuberingstid 45 minutter. 23A: $\Delta([ADP]/[ATP])$ mot cellekonsentrasjon, målt på HPLC-UV. 23B: Prosentvis reduksjon i p70 S6K-substrat mot cellekonsentrasjon. LC-MS/MS-analyse uten internstandard.

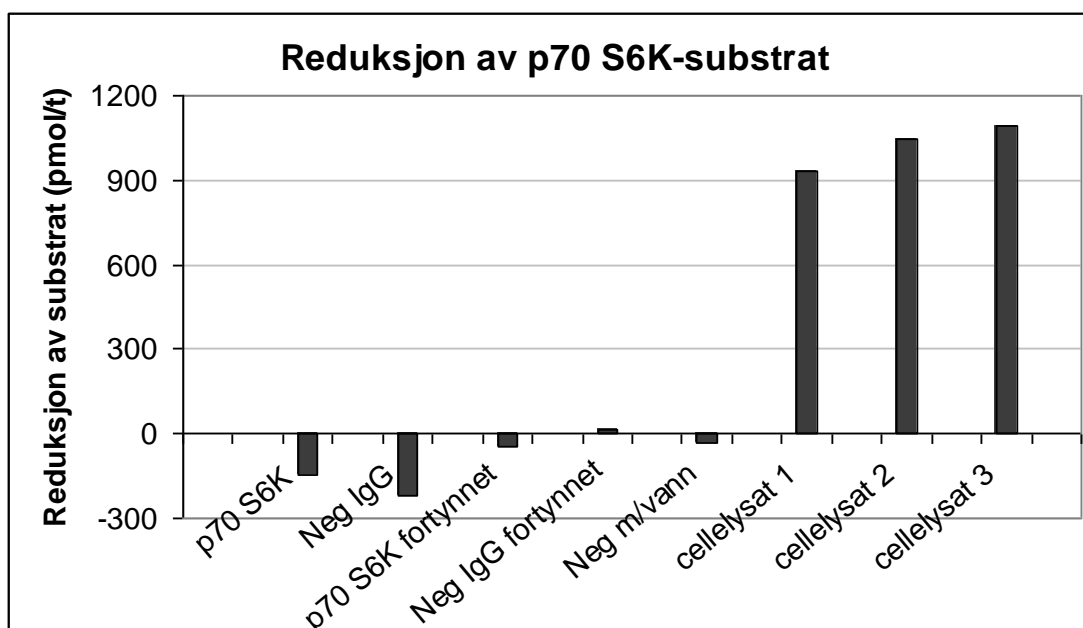
Resultatene fra forsøk med økende cellekonsentrasjoner viste en positiv sammenheng mellom cellekonsentrasjon og $\Delta([ADP]/[ATP])$, samt mellom cellekonsentrasjon og reduksjon i substrat. For prøvene med 0,2 millioner celler/mL i enzymassayet var det i snitt 6,0 % substratreduksjon (4,5 og 7,5 %), mens det for prøvene med 4 millioner celler/mL var i snitt 48,3 % reduksjon (56,8 og 39,9 %). Også disse forsøkene ble gjort før internstandarden var tatt i bruk. Det er sannsynlig at man ville oppnådd mindre spredning ved å benytte internstandard.

5.3.3 Immunpresipitering av p70 S6K

For å bekrefte at det virkelig var p70 S6K som stod for omdanning av p70 S6K-substratet, ble det forsøkt å isolere enzymet ved hjelp av immunpresipitering, og deretter bruke dette i enzymassayet. Det ble også benyttet en negativ kontroll med uspesifikt IgG fra kanin. I det første forsøket, med PBMC fra en frisk person, ble det observert substratreduksjon for p70 S6K-prøven og den negative kontrollen på henholdsvis 6,4 og 5,0 %. Selv om det var større reduksjon i prøvene med p70 S6K, var forskjellen liten. Dette forsøket kunne ikke bekrefte at det virkelig var p70 S6K som stod for omdanning (fosforylering) av substratet.

Da forsøket ble gjentatt (se figur 24), ble volumet av celleekstraksjonsbuffer under immunpresipiteringen oppskalert fra 40 μL til 500 μL . Det ble også inkludert prøver der eluatet av immunpresipitert p70 S6K og den negative kontrollen ble fortynnet fire ganger, samt én negativ kontroll der lysatet var erstattet med vann og 3 parallelle prøver med cellelysat av PBMC. Alt materialet ble tatt ut fra samme PBMC suspensjon.

Det ble heller ikke i dette forsøket påvist at p70 S6K stod for reduksjon av substratet. Det ble målt høyere substratkonsentrasjoner i prøvene som var inkubert i forhold til de ikke-inkuberte, både for immunpresipitert p70 S6K og uspesifikk IgG negativ kontroll. For prøvene som var fortynnet og negativ kontroll bestående av vann istedenfor cellelysat, var det ingen betydelig forskjell mellom prøvene som var inkubert og ikke inkubert. Imidlertid var det en relativt stor reduksjon av substrat i prøvene der enzymassayet var gjort direkte i cellelysat fra PBMC (1 334 000 celler/mL i enzymassay). Reduksjonen var på 935-1093 pmol/time, som tilsvarer 30,3-33,5 % reduksjon.



Figur 24. Enzymassay etter immunpresipitering av p70 S6K i PBMC, samt direkte analyse i PBMC-lysats. Negativ kontroll bestod av immunpresipitering i PBMC med uspesifikt IgG fra kanin, eller vann i stedet for cellelysats. Eluatene fra immunpresipiteringen ble i tillegg analysert etter fire ganger fortynning. Figuren viser reduksjon av p70 S6K-substrat ved inkuberingstid 45 minutter.

5.3.4 Utprøving i pasientgrupper

Det ble til slutt forsøkt å gjennomføre enzymassayet i to ulike pasientgrupper og friske personer; transplanterte pasienter som brukte takrolimus, transplanterte som brukte mTOR-hemmere og en gruppe friske frivillige.

Tabell 1. p70 S6K-målinger i PBMC fra pasienter og friske personer

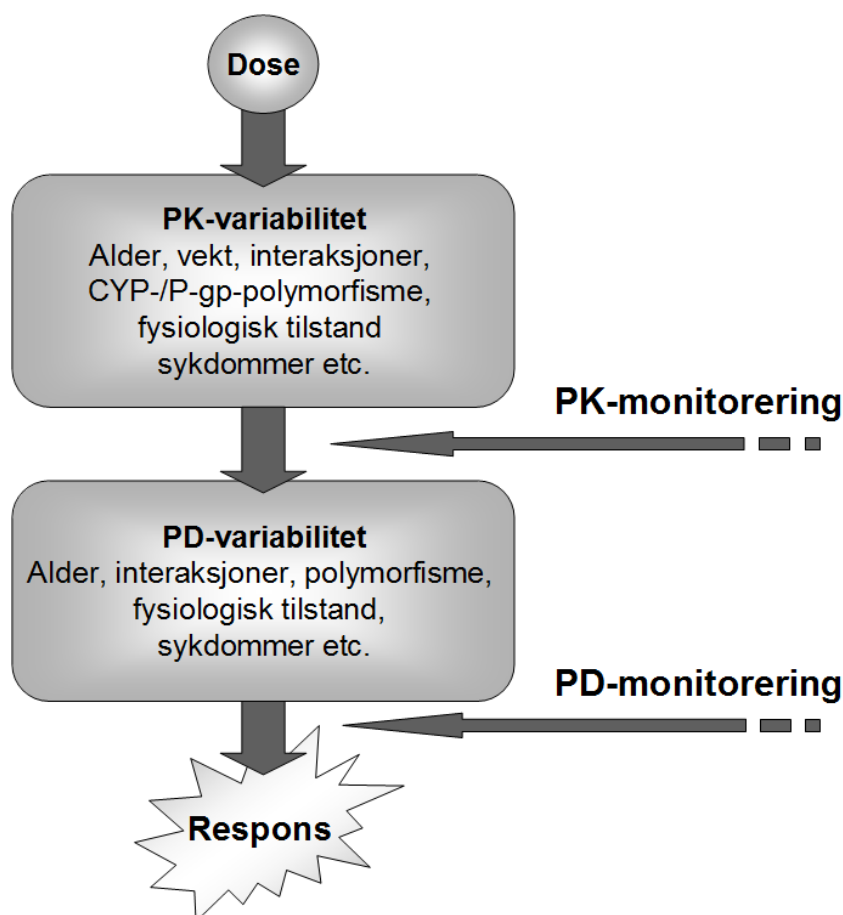
Gruppe	Median reduksjon av p70 S6K-substrat ($\mu\text{mol/time}/10^6$ celler)	Område (min–maks)
Takrolimus (n=4)	281	258-398
mTOR-hemmere (n=6)	244	216-351
Friske frivillige (n=5)	281	230-534

Median substratreduksjon var lavest i gruppen som brukte mTOR-hemmere, se tabell 1. Dette stemte med hypotesen om at disse pasientene skal ha lavere aktivitet av p70 S6K. Imidlertid ble det ikke funnet signifikante forskjeller da det ble utført non-parametrisk Mann-Whitney U-test der mTOR-gruppen ble sammenlignet med de to andre gruppene ($P > 0,05$).

6 Diskusjon

6.1 Generelt om farmakodynamisk monitorering

En generell fordel med farmakodynamisk fremfor farmakokinetisk monitorering, er at man kan fange opp effekten av flere typer variabilitet, se figur 25. Farmakokinetisk monitorering fanger kun opp variasjoner som påvirker kinetikken, som for eksempel variabel absorpsjon eller metabolisme. Ved å monitorere farmakodynamikken til et legemiddel kan man også fange opp variasjoner i effekten, som for eksempel farmakodynamiske interaksjoner eller polymorfismer i målmolekyler.



Figur 25. PK-PD-monitorering.

Når man skal monitorere den farmakodynamiske effekten av immundempende legemidler har man valget mellom å bruke legemiddelspesifikke eller -uspesifikke markører. I dette

prosjektet var målet å finne en spesifikk metode for å bestemme effekten av mTOR-hemmere. Fordelen ved å monitorere den farmakodynamiske effekten ved bruk av legemiddelspesifikke metoder er at man kan beskrive hvor stor del av effekten, og muligens også bivirkningene, et bestemt legemiddel bidrar til.

I likhet med andre immundempende legemidler, brukes mTOR-hemmere i kombinasjon med flere andre immundempende legemidler. Det kan derfor være en fordel å kunne beskrive den totale immundempende effekten av hele det immundempende regimet. Det er utviklet flere assay som tar sikte på å beskrive immunstatus hos transplanterte pasienter. Dette kan for eksempel gjøres ved å måle intracellulær ATP (67), lymfocytproliferasjon eller nivåer av IL-2 (23).

En svakhet ved begge de to enzymassayene som ble utprøvd i dette prosjektet er at de kun måler en parameter hver. Signalveien via mTOR er svært kompleks, og det er flere involverte signalveier både oppstrøms og nedstrøms for mTOR-kompleksene. Det er derfor mulig at det ikke er tilstrekkelig å bestemme aktivitet/fosforylering av en av kinasene for å kunne predikere/beskrive den farmakodynamiske effekten av mTOR-hemmere.

En styrke ved 4E-BP1-assayet fremfor p70 S6K-assayet er at dette direkte kvantifiserer en reaksjon som katalyseres av mTOR. Ved p70 S6K-assayet bruker man en mer indirekte parameter da man måler aktiviteten av en kinase som påvirkes av mTOR. Det kan dermed tenkes at det vil være flere muligheter for påvirkning av p70 S6K-aktivitet som ikke nødvendigvis kontrolleres av mTOR.

6.2 Utprøving av 4E-BP1 enzymassay

Det er tidligere beskrevet at nivået av fosforylert 4E-BP1 nedreguleres ved behandling med mTOR-hemmere ved kreft (68), og at dette kan være en god markør for effekt av legemidlene på tumorvekst (69). Det kan derfor tenkes at fosforylering av 4E-BP1 også kan være en god markør for den farmakologiske effekten av mTOR-hemmere i transplantasjonssammenheng.

Resultater fra våre tidlige forsøk indikerte at $\Delta[\text{ADP}]$ kunne være et godt mål på mTOR-aktivitet. Kurven som viste $\Delta[\text{ADP}]$ mot tilsatt ATP-konsentrasjon kunne se ut til å følge

Michaelis-Menten-kinetikk, bortsett fra noen punkter (se figur 13). Det ble antatt at det kunne være noe galt med disse prøvene, og forsøket ble gjentatt for å bekrefte dette. Da forsøket ble gjentatt viste det seg imidlertid at resultatene ikke var reproducerbare.

Resultatene fra de første substrat-titreringsforsøkene viste at $\Delta[\text{ATP}]$ muligens kunne fungere til å kvantifisere mTOR-aktivitet. Imidlertid var heller ikke dette mulig å reproducere da forsøket ble gjentatt. En annen observasjon som ble gjort i de tilfellene der kurven kunne se ut som den fulgte Michaelis-Menten kinetikk, var at for de laveste verdiene på x-aksen ble y-verdiene negative. Dette er vanskelig å forklare ut i fra enzymkinetiske modeller.

Forsøket der det ble gjort åtte paralleller av samme enzymassay, klarte ikke å vise at ATP-forbruket var høyere i prøvene med mTOR-substrat i forhold til prøvene der det ikke var tilsatt substrat. Dette kan tyde på at enzymassayet ikke fungerer som antatt.

Resultater fra målinger analysert ved hjelp av luminescens og HPLC-UV korrelerte relativt godt med hverandre. Dermed ble det antatt at det ikke var noe galt med kvantifiseringsmetodene, men at enzymassayet ikke fungerte optimalt.

Konsentrasjonene av ATP og ADP i prøvene med og uten substrat var relativt like, og dermed ble $\Delta[\text{ATP}]$, $\Delta[\text{ADP}]$ og særlig $\Delta([\text{ADP}]/[\text{ATP}])$ svært følsomme for små variasjoner i konsentrasjonene. For å få til et oppsett som kan fungere i praksis bør $\Delta[\text{ATP}]$ og $\Delta[\text{ADP}]$ være større, slik at de ikke påvirkes i like stor grad av små, naturlige variasjoner som vil forekomme.

Resultatene fra forsøk med GFP-4E-BP1 som substrat viste seg å være sprikende og lite reproducerbare. Verken $\Delta[\text{ADP}]$, $\Delta[\text{ATP}]$ eller $\Delta([\text{ADP}]/[\text{ATP}])$ egnet seg til å kvantifisere aktiviteten av mTOR i dette oppsettet. Det kan være flere årsaker til dette:

- GFP-4E-BP1 er ikke identisk med det endogene 4E-BP1. Substratet er syntetisert for bruk i rene løsninger av rekombinant mTOR-enzym, og det er ikke testet ut for bruk i cellelysater. Det er mulig at GFP-proteinet interfererer med noe i cellelysater slik at enzymreaksjonen ikke fungerer som ønsket.
- ADP og ATP er molekyler som inngår i svært mange reaksjoner i celler. Muligens vil de på grunn av dette naturlig variere så mye at det ikke kan oppveies for i dette oppsettet.

- mTORC1 er ikke konstitutivt aktivt i celler. Proteinkomplekset har en kompleks oppstrøms signalvei, og det kan være at stimulering via insulinreseptor eller CD3-, CD28- og IL-2-reseptor ikke er godt nok for å øke aktiviteten tilstrekkelig. Det kan også være at stimuleringsbetingelsene som ble benyttet ikke var optimale.

Andre studier som har brukt fosforylert 4E-BP1 for å bestemme mTOR-aktivitet, har gjort målingene direkte på proteinet (68,69). Våre resultater indikerer at kvantifisering av fosforyleringen indirekte via ADP og ATP ikke er spesifikt nok. Det er mulig at enzymassayet kan fungere dersom kvantifiseringen baserer seg på GFP-4E-BP1 istedenfor ADP og ATP. Dette vil være en mer spesifikk markør for aktiviteten av mTOR, og man vil dermed unngå mye støy som det vil være når ADP og ATP brukes for å bestemme enzymaktiviteten.

6.3 Utprøving av p70 S6K assay

Det er tidligere beskrevet metoder for direkte måling av mengde fosforylert p70 S6K (62,63) og aktiviteten av p70 S6K (61). Peralba *et al.* har benyttet et slikt oppsett for å bestemme den farmakodynamiske effekten av temsirolimus til bruk i kreftbehandling. De har i sin prosedyre ikke utført enzymassayet direkte i cellelysater fra PBMC, men først isolert p70 S6K ved hjelp av immunpresipitering. De undersøkte også den intra- og interindividuelle variasjonen i p70 S6K-aktivitet, og estimerte disse til henholdsvis $< 14 \%$ og $< 40 \%$. Den lave intraindividuelle variabiliteten indikerer at aktiviteten ikke endres spontant over tid og at p70 S6K dermed kan være en egnet markør for farmakodynamisk monitorering. Det ble også funnet en lineær sammenheng mellom tid til tumorprogresjon og aktivitet av p70 S6K ($n=9$).

Ved immundempende behandling tilstreber man vanligvis den lavest mulige konsentrasjonen som gir tilstrekkelig immundempende effekt for å minimalisere bivirkninger. Ved lave blodkonsentrasjoner av sirolimus er det observert at det er liten grad av korrelasjon mellom C_0 og nivå av fosforylert p70 S6K (62). Hartmann *et al.* fant imidlertid en bedre sammenheng mellom nivå av fosforylert p70 S6K og reaksjon enn mellom C_0 og reaksjon. En studie har også vist at nivå av fosforylert p70 S6K øker ved reaksjonsepisoder (70). Den immundempende behandlingen blir stadig bedre, og de tilstrebede blodkonsentrasjonene for disse legemidlene reduseres. Det vil det derfor bli stadig mer aktuelt med farmakodynamisk

monitorering, for å bestemme hvilke pasienter som kan få lave doser legemiddel, uten å risikere reaksjonsepisoder.

I dette prosjektet ble det ikke påvist noen aktivitet av p70 S6K i stimulerte CD4⁺ celler når $\Delta([ADP]/[ATP])$ ble brukt som måleparameter. Da $\Delta([ADP]/[ATP])$ ble brukt for å måle aktiviteten av p70 S6K i PBMC indikerte resultatene en sammenheng mellom økende $\Delta([ADP]/[ATP])$ og inkuberingstid eller cellekonsentrasjon. Imidlertid var spredningen stor. Da det ble gjort tilsvarende forsøk der enzymaktiviteten ble bestemt ved substratreduksjon, bekreftet dette tendensen med større substratreduksjon ved økende cellekonsentrasjon eller lenger inkuberingstid.

Da økende cellekonsentrasjon fører til større reduksjon av p70 S6K-substratet, indikerer dette at det er en enzymatisk reaksjon som omdanner eller bryter ned peptidet. Det ble ikke observert noen reduksjon av substrat da det ble tilsatt vann istedenfor cellelysatsat til assayet. Imidlertid kan man ikke ut i fra dette slå fast at det er fosforylering via p70 S6K som bidrar til denne reduksjonen. For å bekrefte dette ble det forsøkt å gjøre en immunpresipitering av p70 S6K og deretter utføre enzymassayet. Dette var imidlertid ikke vellykket, noe det kan være flere årsaker til. Det er mulig at celleekstraksjonsbufferen inaktiverer p70 S6K eller at selve immunpresipiteringen var mislykket, slik at det ikke var aktivt p70 S6K i eluatet som ble brukt i assayet. Det kan også være at enzymassayet eller analysemetoden ikke fungerer optimalt når det brukes isolert enzym og ikke cellelysatsat. Isolert p70 S6K ble også løst i en elueringsbuffer som muligens kan inneholde stoffer som kan interferere med assayet eller kvantifiseringen.

Da assayet ble gjennomført med prøver fra ulike pasientgrupper, ble det observert lavest median substratreduksjon i gruppen som brukte mTOR-hemmere. Dette stemmer med hypotesen om at disse pasientene skal ha lavere aktivitet av p70 S6K enn de andre gruppene. I dette begrensede datamaterialet var forskjellene mellom gruppene ikke signifikante. Det er mulig at forskjellene i fosforyleringshastighet er små, og at man dermed trenger større pasientgrupper for å dokumentere signifikante forskjeller. Et annet aspekt er at man i denne pilotundersøkelsen ikke registrerte informasjon som kunne være relevante for tolkningen av resultatene, som for eksempel konsentrasjoner av legemiddel i blod, hvor lenge pasientene hadde brukt legemidlene eller pasientenes immunstatus. Dette kan muligens påvirke

aktiviteten av p70 S6K. Det er også mulig at p70 S6K-substratet ikke er spesifikt nok, slik at det også blir omdannet av andre enzymer enn p70 S6K.

En styrke for den foreløpige metoden for å måle fosforyleringshastigheten katalysert av p70 S6K, er at man kan bruke lysat fra PBMC direkte i enzymassayet. Isolering av PBMC er en enkel metode for celleisolering. Det er svært tids- og ressursbesparende å slippe isolering og stimulering av CD4⁺ celler. En svakhet ved denne metoden er at det kun måles hvor mye av p70 S6K-substratet som blir borte. Kvantifisering av fosforylert substrat vil gi bedre kontroll på hva som skyldes p70 S6K-aktivitet og hva som eventuelt omdannes ved andre mekanismer.

6.4 Veien videre

Videre i dette prosjektet bør man finne en metode der man kan bekrefte at det virkelig er p70 S6K som står for fosforylering av substratet. Det finnes ingen kommersielt tilgjengelige hemmere av p70 S6K. Enzymet må derfor enten isoleres og fremdeles utvise en stor grad av aktivitet i assayet, eller man må konstruere en spesifikk hemmer av p70 S6K. Det bør også undersøkes hvordan den farmakodynamiske effekten henger sammen med klinisk utfall.

Dersom man ikke klarer å vise noen sammenheng mellom behandling med mTOR-hemmere og reduksjon av p70 S6K-substrat, kan det være aktuelt å prøve andre fremgangsmåter. Det finnes metoder for å måle mengde fosforylert p70 S6K i cellelysater (for eksempel AlphaScreen Sure Fire, Perkin Elmer (Waltham, MA) og p-p70 S6K ELISA, Invitrogen (Carlsbad, CA)). Det kan også være aktuelt å kvantifisere fosforylert GFP-4E-BP1 ved hjelp av TR-FRET.

7 Konklusjon

Det ser ikke ut til at oppsettet for å måle fosforylering av GFP-4E-BP1 fungerer i praksis. Det er vanskelig å si om dette skyldes at ADP og ATP varierer for mye naturlig, eller om den enzymatiske reaksjonen ikke fungerer som antatt. Dersom man skal gå videre med dette oppsettet, kan det være hensiktsmessig å etablere en metode for å kvantifisere fosforylert GFP-4E-BP1.

Metoden som måler fosforyleringshastigheten i reaksjonen som katalyseres av p70 S6K virker mer lovende. Det er imidlertid for tidlig å slå fast om assayet kan brukes for å bestemme farmakodynamikken hos pasienter. Man bør enten isolere p70 S6K eller finne en selektiv hemmer av enzymet, for å slå fast at det virkelig er denne kinasen som bidrar til omdanningen. Et alternativ som kan forbedre metodens spesifisitet, vil være å måle mengden fosforylert p70 S6K-substrat i stedet for substratreduksjon. Før metoden eventuelt kan brukes i studier, må den også valideres.

Når man har funnet en metode som fungerer teknisk, må man undersøke hvordan resultatene henger sammen med klinisk utfall. Man bør også finne ut om denne typen monitorering er bedre enn farmakokinetiske målinger i klinikken.

Kildeliste

1. Bogen, B., Munthe, L.A. (2002). "Immunologi.", 2. utgave. Universitetsforlaget, Oslo, Norge.
2. Store norske leksikon. Store Norske Leksikon, transplantasjon.
http://www.snl.no/.sml_artikkel/transplantasjon (Tilgjengelig 28.4.2010).
3. Scandiatransplant. Scandiatransplant.
http://www.scandiatransplant.org/quarter_4_2009.htm (Tilgjengelig 28.4.2010).
4. Thorsby, E. (2006). "[Transplantation medicine in Norway through 50 years]." Tidsskr Nor Laegeforen. 126: 3305-3310.
5. Scholz, T., Karlsen, T.H., Sanengen, T., Schrumpf, E., Foss, A., Line, P.D., et al. (2009). "[Liver transplantation in Norway through 25 years]." Tidsskr Nor Laegeforen. 129: 2587-2592.
6. Vartdal, F., Thorsby, E. (1999). "[Immunologic reactions in transplantation]." Tidsskr Nor Laegeforen. 119: 3167-3170.
7. Rikshospitalet. Levertransplantasjonsprotokoll.
<http://www.rikshospitalet.no/iKnowBase/Content/413563/Leverprotokollen.pdf> (Tilgjengelig 28.4.2010).
8. Parham, P. (2005). "The immune system.", 2. utgave. Garland Science, New York, NY.
9. Norsk nyremedisinsk forening. Protokoll for nyre- og pancreastransplantasjon.
<http://www.nephro.no/foreningsnytt/Tx-Protokoll-total-2010.pdf> (Tilgjengelig 28.4.2010).
10. Nasjonalt folkehelseinstitutt. Reseptregisteret. www.reseptregisteret.no (Tilgjengelig 28.4.2010).
11. Naesens, M., Kuypers, D.R., Sarwal, M. (2009). "Calcineurin inhibitor nephrotoxicity." Clin J Am Soc Nephrol. 4: 481-508.
12. Jose, M. (2007). "The CARI guidelines. Calcineurin inhibitors in renal transplantation: adverse effects." Nephrology (Carlton). 12 Suppl 1: S66-S74.
13. Subramanian, S., Trence, D.L. (2007). "Immunosuppressive agents: effects on glucose and lipid metabolism." Endocrinol Metab Clin North Am. 36: 891-905.
14. Staatz, C.E., Tett, S.E. (2007). "Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients." Clin Pharmacokinet. 46: 13-58.

15. Czock, D., Keller, F., Rasche, F.M., Haussler, U. (2005). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids." *Clin Pharmacokinet.* 44: 61-98.
16. Flechner, S.M. (2009). "Sirolimus in kidney transplantation indications and practical guidelines: de novo sirolimus-based therapy without calcineurin inhibitors." *Transplantation.* 87: S1-S6.
17. Augustine, J.J., Bodziak, K.A., Hricik, D.E. (2007). "Use of sirolimus in solid organ transplantation." *Drugs.* 67: 369-391.
18. Rowland M, Tozer T (1995). "Clinical Pharmacokinetics, Concepts and Application.", 3. utgave. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
19. Budde, K., Glander, P. (2008). "Pharmacokinetic principles of immunosuppressive drugs." *Ann Transplant.* 13: 5-10.
20. Le Meur, Y., Buchler, M., Thierry, A., Caillard, S., Villemain, F., Lavaud, S., et al. (2007). "Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation." *Am J Transplant.* 7: 2496-2503.
21. van Gelder, T., Silva, H.T., de Fijter, J.W., Budde, K., Kuypers, D., Tyden, G., et al. (2008). "Comparing mycophenolate mofetil regimens for de novo renal transplant recipients: the fixed-dose concentration-controlled trial." *Transplantation.* 86: 1043-1051.
22. Yatscoff, R.W., Aspeslet, L.J., Gallant, H.L. (1998). "Pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs." *Clin Chem.* 44: 428-432.
23. Bohler, T., Nolting, J., Kamar, N., Gurrachaa, P., Reisener, K., Glander, P., et al. (2007). "Validation of immunological biomarkers for the pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs in humans." *Ther Drug Monit.* 29: 77-86.
24. Hall, M.N. (2008). "mTOR-what does it do?" *Transplant Proc.* 40: S5-S8.
25. Thomson, A.W., Turnquist, H.R., Raimondi, G. (2009). "Immunoregulatory functions of mTOR inhibition." *Nat Rev Immunol.* 9: 324-337.
26. Weichhart, T., Saemann, M.D. (2009). "The multiple facets of mTOR in immunity." *Trends Immunol.* 30: 218-226.
27. Felleskatalogen. Felleskatalogen.
<http://www.felleskatalogen.no/felleskatalogen/show.do?filename=/content/static/pdf/FormelRegister.pdf&frameset=1&thin=0&href=0> (Tilgjengelig 28.4.2010).
28. Oudard, S., Medioni, J., Ayllon, J., Barrascourt, E., Elaidi, R.T., Balcaceres, J., et al. (2009). "Everolimus (RAD001): an mTOR inhibitor for the treatment of metastatic renal cell carcinoma." *Expert Rev Anticancer Ther.* 9: 705-717.

29. Teachey, D.T., Grupp, S.A., Brown, V.I. (2009). "Mammalian target of rapamycin inhibitors and their potential role in therapy in leukaemia and other haematological malignancies." *Br J Haematol.* 145: 569-580.
30. Schuler, W., Sedrani, R., Cottens, S., Haberlin, B., Schulz, M., Schuurman, H.J., et al. (1997). "SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo." *Transplantation.* 64: 36-42.
31. Sanchez-Fructuoso, A.I. (2008). "Everolimus: an update on the mechanism of action, pharmacokinetics and recent clinical trials." *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 4: 807-819.
32. Vezina, C., Kudelski, A., Sehgal, S.N. (1975). "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle." *J Antibiot (Tokyo).* 28: 721-726.
33. Janes, M.R., Fruman, D.A. (2009). "Immune regulation by rapamycin: moving beyond T cells." *Sci Signal.* 2: e25.
34. Agaard-Tillery, K.M., Jelinek, D.F. (1994). "Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by rapamycin." *Cell Immunol.* 156: 493-507.
35. De Serres, S.A., Sayegh, M.H., Najafian, N. (2009). "Immunosuppressive drugs and Tregs: a critical evaluation!" *Clin J Am Soc Nephrol.* 4: 1661-1669.
36. Zimmerman, J.J., Kahan, B.D. (1997). "Pharmacokinetics of sirolimus in stable renal transplant patients after multiple oral dose administration." *J Clin Pharmacol.* 37: 405-415.
37. Leung, L.Y., Lim, H.K., Abell, M.W., Zimmerman, J.J. (2006). "Pharmacokinetics and metabolic disposition of sirolimus in healthy male volunteers after a single oral dose." *Ther Drug Monit.* 28: 51-61.
38. Crowe, A., Bruelisauer, A., Duerr, L., Guntz, P., Lemaire, M. (1999). "Absorption and intestinal metabolism of SDZ-RAD and rapamycin in rats." *Drug Metab Dispos.* 27: 627-632.
39. Zimmerman, J.J., Ferron, G.M., Lim, H.K., Parker, V. (1999). "The effect of a high-fat meal on the oral bioavailability of the immunosuppressant sirolimus (rapamycin)." *J Clin Pharmacol.* 39: 1155-1161.
40. Streit, F., Christians, U., Schiebel, H.M., Napoli, K.L., Ernst, L., Linck, A., et al. (1996). "Sensitive and specific quantification of sirolimus (rapamycin) and its metabolites in blood of kidney graft recipients by HPLC/electrospray-mass spectrometry." *Clin Chem.* 42: 1417-1425.
41. Legemiddelverket. SPC; Rapamune.
http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx?SearchID=375af49b-929b-4ea8-b5c2-55d00b0f62eb (Tilgjengelig 28.4.2010).

42. Mahalati, K., Kahan, B.D. (2001). "Clinical pharmacokinetics of sirolimus." *Clin Pharmacokinet.* 40: 573-585.
43. Kuypers, D.R. (2005). "Immunosuppressive drug monitoring - what to use in clinical practice today to improve renal graft outcome." *Transpl Int.* 18: 140-150.
44. Legemiddelverket. SPC; Certican.
http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx?SearchID=858f51c7-31cc-42e6-a776-a58d981d99ea (Tilgjengelig 28.4.2010).
45. Lorber, M.I., Ponticelli, C., Whelchel, J., Mayer, H.W., Kovarik, J., Li, Y., et al. (2005). "Therapeutic drug monitoring for everolimus in kidney transplantation using 12-month exposure, efficacy, and safety data." *Clin Transplant.* 19: 145-152.
46. Anglicheau, D., Le, C.D., Lechaton, S., Laurent-Puig, P., Kreis, H., Beaune, P., et al. (2005). "Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy." *Am J Transplant.* 5: 595-603.
47. Le Meur, Y., Djebli, N., Szelag, J.C., Hoizey, G., Toupance, O., Rerolle, J.P., et al. (2006). "CYP3A5*3 influences sirolimus oral clearance in de novo and stable renal transplant recipients." *Clin Pharmacol Ther.* 80: 51-60.
48. Mourad, M., Mourad, G., Wallemacq, P., Garrigue, V., Van, B.C., Van, K., V, et al. (2005). "Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids." *Transplantation.* 80: 977-984.
49. Napoli, K.L., Wang, M.E., Stepkowski, S.M., Kahan, B.D. (1998). "Relative tissue distributions of cyclosporine and sirolimus after concomitant peroral administration to the rat: evidence for pharmacokinetic interactions." *Ther Drug Monit.* 20: 123-133.
50. Bai, S., Stepkowski, S.M., Kahan, B.D., Brunner, L.J. (2004). "Metabolic interaction between cyclosporine and sirolimus." *Transplantation.* 77: 1507-1512.
51. Kahan, B.D. (2000). "Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group." *Lancet.* 356: 194-202.
52. Podder, H., Stepkowski, S.M., Napoli, K.L., Clark, J., Verani, R.R., Chou, T.C., et al. (2001). "Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations." *J Am Soc Nephrol.* 12: 1059-1071.
53. MacDonald, A.S. (2001). "A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts." *Transplantation.* 71: 271-280.
54. Chueh, S.C., Kahan, B.D. (2003). "Dyslipidemia in renal transplant recipients treated with a sirolimus and cyclosporine-based immunosuppressive regimen: incidence, risk factors, progression, and prognosis." *Transplantation.* 76: 375-382.

55. Penn, I. (2000). "Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression." *Drug Saf.* 23: 101-113.
56. Kauffman, H.M., Cherikh, W.S., Cheng, Y., Hanto, D.W., Kahan, B.D. (2005). "Maintenance immunosuppression with target-of-rapamycin inhibitors is associated with a reduced incidence of de novo malignancies." *Transplantation.* 80: 883-889.
57. Luan, F.L., Ding, R., Sharma, V.K., Chon, W.J., Lagman, M., Suthanthiran, M. (2003). "Rapamycin is an effective inhibitor of human renal cancer metastasis." *Kidney Int.* 63: 917-926.
58. Neumayer, H.H., Paradis, K., Korn, A., Jean, C., Fritsche, L., Budde, K., et al. (1999). "Entry-into-human study with the novel immunosuppressant SDZ RAD in stable renal transplant recipients." *Br J Clin Pharmacol.* 48: 694-703.
59. Kovarik, J.M., Hartmann, S., Figueiredo, J., Rordorf, C., Golor, G., Lison, A., et al. (2002). "Effect of food on everolimus absorption: quantification in healthy subjects and a confirmatory screening in patients with renal transplants." *Pharmacotherapy.* 22: 154-159.
60. Reichling, L.J., Lebakken, C.S., Riddle, S.M., Vedvik, K.L., Robers, M.B., Kopp, L.M., et al. (2008). "Pharmacological characterization of purified recombinant mTOR FRB-kinase domain using fluorescence-based assays." *J Biomol Screen.* 13: 238-244.
61. Peralba, J.M., DeGraffenried, L., Friedrichs, W., Fulcher, L., Grunwald, V., Weiss, G., et al. (2003). "Pharmacodynamic Evaluation of CCI-779, an Inhibitor of mTOR, in Cancer Patients." *Clin Cancer Res.* 9: 2887-2892.
62. Hartmann, B., Schmid, G., Graeb, C., Bruns, C.J., Fischereder, M., Jauch, K.W., et al. (2005). "Biochemical monitoring of mTOR inhibitor-based immunosuppression following kidney transplantation: a novel approach for tailored immunosuppressive therapy." *Kidney Int.* 68: 2593-2598.
63. Leogrande, D., Teutonico, A., Ranieri, E., Saldarelli, M., Gesualdo, L., Schena, F.P., et al. (2007). "Monitoring biological action of rapamycin in renal transplantation." *Am J Kidney Dis.* 50: 314-325.
64. Vethe, N.T., Bremer, S., Rootwelt, H., Bergan, S. (2008). "Pharmacodynamics of mycophenolic acid in CD4+ cells: a single-dose study of IMPDH and purine nucleotide responses in healthy individuals." *Ther Drug Monit.* 30: 647-655.
65. Ruckemann, K., Fairbanks, L.D., Carrey, E.A., Hawrylowicz, C.M., Richards, D.F., Kirschbaum, B., et al. (1998). "Leflunomide inhibits pyrimidine de novo synthesis in mitogen-stimulated T-lymphocytes from healthy humans." *J Biol Chem.* 273: 21682-21691.
66. Jagodzinski, P., Lizakowski, S., Smolenski, R.T., Slominska, E.M., Goldsmith, D., Simmonds, H.A., et al. (2004). "Mycophenolate mofetil treatment following renal transplantation decreases GTP concentrations in mononuclear leucocytes." *Clin Sci (Lond).* 107: 69-74.

67. Millan, O., Sanchez-Fueyo, A., Rimola, A., Guillen, D., Hidalgo, S., Benitez, C., et al. (2009). "Is the intracellular ATP concentration of CD4+ T-Cells a predictive biomarker of immune status in stable transplant recipients?" *Transplantation*. 88: S78-S84.
68. Boulay, A., Zumstein-Mecker, S., Stephan, C., Beuvink, I., Zilbermann, F., Haller, R., et al. (2004). "Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells." *Cancer Res.* 64: 252-261.
69. Dudkin, L., Dilling, M.B., Cheshire, P.J., Harwood, F.C., Hollingshead, M., Arbuck, S.G., et al. (2001). "Biochemical correlates of mTOR inhibition by the rapamycin ester CCI-779 and tumor growth inhibition." *Clin Cancer Res.* 7: 1758-1764.
70. Holzkecht, Z.E., Kuypers, K.L., Plummer, T.B., Williams, J., Bustos, M., Gores, G.J., et al. (2002). "Apoptosis and cellular activation in the pathogenesis of acute vascular rejection." *Circ Res.* 91: 1135-1141.